



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ

BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİ

**PANC-1 HÜCRE HATTINDA RESVERATROL'ÜN NF-KB VE HTERT
EKSPRESYONUNA BAĞLI TELOMERAZ AKTİVİTESİNE ETKİSİ**

Proje No: TYL- 2019-20730

Yüksek Lisans Tez Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Doç. Dr. Zuhale EROĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü/Tıbbi Biyoloji A.B.D.

Buşra BARA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü/Tıbbi Biyoloji A.B.D.

Haziran 2021

İZMİR

Önsöz

Bu tez kapsamındaki çalışma, Türkiye ve Dünya’da hızlı artış gösteren ve spesifik semptomlar göstermeden ciddi mortalite nedeni olan pankreas kanseri tedavisinde yeni bir tedavi bakış açısı geliştirmeyi amaçlamıştır. Özellikle vücutta ciddi yan etki gösteren kemoteropik etkenlere bir alternatif olarak, günümüz çalışmalarında da popülerliği oldukça artan doğal bir bileşik olan Resveratrol’ün etkileri değerlendirilmiş olup literatürde benzeri olmayan bu çalışmanın sonraki çalışmalara referans olması umulmaktadır.

TYL- 2019-20730 numaralı olan bu yüksek lisans tez çalışması Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir. BAP birimine tüm bu desteklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

İzmir, 22.06.2021

Buşra BARA

İçindekiler

Önsöz	III
İçindekiler	IV
Tablolar Dizini.....	VI
Şekiller Dizini.....	VII
Grafikler Dizini	VIII
Özet.....	IX
Abstract.....	XI
1. Giriş	1
1.1. Araştırmanın Problemi.....	1
1.2. Araştırmanın Sorusu	3
1.3. Araştırmanın Hipotezleri	5
1.4. Araştırmanın Varsayımları.....	6
1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları	7
1.6. Araştırmanın Amacı	7
2. Genel Bilgiler	9
2.1. Pankreasın Yapısı ve Fonksiyonları.....	9
2.2. Pankreas Kanseri	9
2.2.1. Patogenez	10
2.2.2. Evreleme, Tanı ve Tedavi.....	10
2.3. Telomer ve Telomerase	11
2.4. hTER ve hTERT	12
2.5. NF-κB (Nükleer Faktör Kappa B).....	13
2.6. hTERT, NF-κB ve Kansere İlişkisi.....	13
2.7. Resveratrol.....	14
2.7.1. Resveratrol ve Kansere Terapi.....	15
3. Gereç ve Yöntem	16
3.1. Reaktifler	16
3.2. Hücre Kültürü	16
3.3. Hücrelerin Pasajlanması	18
3.4. Hücrelerin Dondurulması (Kriyoprezervasyon).....	19

3.5.Dondurulmuş Hücre Hatlarının Çözdürülmesi	19
3.6.PANC-1 hücre hattında proliferasyon deneyi	20
3.7.Hücre sitotoksosite deneyi (WST-1)	20
3.8.Apoptoz Deneyi.....	21
3.9.Gen Ekspresyonu	23
3.9.1. Total RNA izolasyonu.....	24
3.9.2.RNA miktar ve saflık ölçümü.....	25
3.9.3.Komplementer DNA (cDNA) Sentezi.....	25
3.9.4. qPCR Analizi.....	26
3.10.Wound Healing Deneyi.....	30
3.11.İstatistiksel Analiz Yöntemleri.....	32
4.Bulgular.....	33
4.1. Proliferasyon Deneyi.....	33
4.2. Resveratrolün hücre canlılık miktarlarına etkisi.....	33
4.3. Resveratrolün hücreler üzerindeki apoptotik etkisi.....	34
4.4. Wound healing Analizi	36
4.5. Etken maddenin hTERT ve NF-κB genlerindeki mRNA ekspresyon düzeylerine etkisinin analizi.....	38
5.Tartışma	40
6.Sonuç ve Öneriler	49
Referanslar.....	50

Tablolar Dizini

Tablo 1. Etken Madde Ana Stok Dilüsyonu.....	16
Tablo 2. cDNA Reaksiyon Miks Karişimi	26
Tablo 3. Kullanılan Gen Primerlerinin Dizilimi Ve Baz Sayıları.....	27
Tablo 4 . GAPDH Primer Kullanım Bilgisi	27
Tablo 5 . hTERT Primer Kullanım Bilgisi	28
Tablo 6 . NF-KB Primer Kullanım Bilgisi	28
Tablo 7. Pcr Reaksiyon Karişımı.....	29
Tablo 8. Pcr Reaksiyon Programı.....	30
Tablo 9 . GAPDH ‘A Göre Normalize Edilen Genlerde Kat Değişiminin Hesaplanması	39

Şekiller Dizini

Şekil 1. Pankreas Kansерinde Resveratrol'ün Apoptoz İndüksiyon Mekanizması.....	4
Şekil 2 . hTERT Ve hTER Alt Birimleri	5
Şekil 3. TERT Aktivasyonu Ve Yolaklarla Bağlantısı	6
Şekil 4. Resveratrol'ün Moleküler Yapısı.....	16
Şekil 5. Panc-1 Hücre Hattının Mikroskopik Görüntüsü	17
Şekil 6. Neubauer Hemositometresi	18
Şekil 7 . Hücrelerde Annexin V ve Pi Etkileşimleri	22
Şekil 8. Wound Healing Deneyinde Yara Hattının Oluşturulması	31
Şekil 9. Resveratrol'ün (Ic ₅₀) Panc-1 Hücre Hattında 72. saatteki Apoptotik Etkisinin Annexin V Sonuçları.....	35
Şekil 10. Hücre Migrasyon Görüntüleri (0, 24, 48 Ve 72h)	37

Grafikler Dizini

Grafik 1. Ülke Bazında Cinsiyete Bağlı Pankreas Kanseri İnsidans Diyagramı.....	1
Grafik 2. Panc-1 Hücre Hattında Proliferasyon Deneyi.....	33
Grafik 3. Panc-1 Hücre Hattında Sitotoksosite Analizi (IC ₅₀ Değeri)	34
Grafik 4. Resveratrol'ün (IC ₅₀) Panc-1 Hücre Hattında 72. saatteki Apoptotik Etkisinin Yüzde Değişimleri	35
Grafik 5. Resveratrolün (IC ₅₀) Panc-1 Hücre Hattında 72. saatteki Apoptotik Etkisinin Kat Değişimleri (***) P<0,001).....	36
Grafik 6. Wound Healing Analizi 24, 48, 72 saatlerin Kontrole Göre Kapanma Yüzdeleri	37
Grafik 7. Resveratrol IC ₅₀ Dozunun hTERT Ve NF-KB mRNA Ekspresyon Seviyelerindeki Kat Değişimleri	38

Özet

PANC-1 hücre hattında Resveratrol'ün NF-κB ve hTERT ekspresyonuna bağlı telomeraz aktivitesine etkisi

Erken teşhisi ve diğer pankreatik hastalıklardan ayırımı oldukça zor olan pankreas kanseri, başta gelişmiş ülkeler olmak üzere dünyadaki en ölümcül malign neoplazmlardan biridir.

Kanser hücrelerinde meydana gelen sınırsız çoğalma yeteneği ile ortaya çıkan ölümsüzlük, telomeraz enziminin artmış aktivitesiyle ilişkilendirilmektedir. Telomeraz aktivasyonu, insan kanserlerinin yaklaşık % 85'inin gelişiminde kritik bir adımdır ve henüz kanser hücrelerinde telomerazın yeniden nasıl aktive edildiği tam olarak anlaşılamamıştır. Bu nedenle kanser tedavisinde telomeraz aktivitesinin inhibisyonu önemli tedavi seçeneklerinden biri gibi gözükmektedir.

Bu tez kapsamında pankreas duktal adenokarsinom hücre hattı olan PANC-1' de doğal bir bileşik olan Resveratrol'ün, telomerazla ilişkilendirilmiş genler olan hTERT ve NF-κB gen ifadesi ve dolayısıyla pankreas kanser gelişimi üzerindeki etkileri incelenmiştir.

PANC-1 hücre hattı uygun ortam ve koşullarda çoğaltılarak WST-1 reaktifi ile proliferasyon ve sitotoksite analizleri gerçekleştirilmiş ve bunların ışığında Resveratrol için IC₅₀ değeri belirlenmiştir. Belirlenmiş olan IC₅₀ dozu kullanılarak; apoptoz, yara kapanma analizi ve telomeraz ilişkili genler olarak belirlediğimiz hTERT ve NF-κB ekspresyon düzeyleri RT-PCR analizleriyle değerlendirilmiştir.

Saptadığımız bulgular ışığında Resveratrol'ün PANC-1 hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisi olduğu tespit edilmiş olup, IC₅₀ değeri 72. saatte 75,80 µM olarak hesaplanmıştır. Tespit edilen IC₅₀ değeri PANC-1 hücre hattına uygulanarak apoptotik etkisi değerlendirilmiştir. Apoptoz sonuçları Annexin V ile değerlendirilmiş ve sonuçlara göre de % 41,9 oranında apoptotik etki tespit edilmiştir. Resveratrol'ün PANC-1 hücre hattında hücre migrasyonu ve invazyonuna olan etkisi yine IC₅₀ değeri uygulanarak bakıldığında, 72. saatlik değeri kontrolle kıyaslandığında % 47 oranında hücre göçünü engelleyerek yara hattının kapanmasında gecikmeye neden olduğu tespit edilmiştir.

Telomeraz ile ilişkili olarak saptadığımız genler olan hTERT ve NF- κ B gen ifadeleri, IC₅₀ dozu uygulanan PANC-1 hücre hattından elde edilen RNA'lar cDNA'ya çevrilerek LightCycler 480 cihazında RT-PCR ile değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonunda Resveratrol'ün, hTERT geninde 1,37 kat, NF- κ B geninde ise 1,55 kat ekspresyon seviyesinde artışa neden olduğu saptanmıştır.

Sonuç olarak Resveratrol PANC-1 hücre hattında sitotoksik etki göstererek apoptoza neden olmuştur. Ayrıca hücre migrasyonunu engelleyerek hücre göçünü engellemiştir. Fakat telomeraz ile ilişkilendirdiğimiz gen ifadelerinde beklenen azalma gözlenmemiştir. Bu nedenle çalışmamız deney kapsamını genişleterek devamlılığını gerektirmektedir.

Anahtar Kelimeler; Resveratrol; telomeraz; hTERT; NF- KB; pankreas kanseri

Abstract

Effect of resveratrol on telomerase activity due to NF- κ B and hTERT expression in PANC-1 cell line

Pancreatic cancer, which is quite difficult to diagnose and differentiate from other pancreatic diseases, is one of the deadliest malignant neoplasms in the world, especially in developed countries.

Immortality, which is caused by the unlimited ability of proliferation in cancer cells, is associated with increased activity of the telomerase enzyme. Telomerase activation is a critical step in the development of about 85% of human cancers and it is not yet fully understood how telomerase is reactivated in cancer cells. Therefore, inhibition of telomerase activity in cancer treatment seems to be one of the important treatment options.

In this thesis, the effects of Resveratrol, a natural compound in pancreatic ductal adenocarcinoma cell line, PANC-1, on genes associated with telomerase, on hTERT and NF- κ B gene expression and thus on pancreatic cancer development.

Proliferation and cytotoxicity analyzes were carried out with the WST-1 reagent by replicating the PANC-1 cell line under the appropriate environment and conditions and IC₅₀ value for Resveratrol was determined in the light of these. By using the determined dose of IC₅₀; The expression levels of hTERT and NF- κ B, which we determined as apoptosis, wound closure analysis and telomerase related genes, were evaluated by RT-PCR analysis.

In the light of the findings we found, Resveratrol has been found to have a cytotoxic effect on the PANC-1 cell line, and its IC₅₀ value was calculated as 75.80 μ M at 72 hours. The apoptotic effect was evaluated by applying the determined IC₅₀ value to the PANC-1 cell line. Apoptosis results were evaluated with Annexin V and according to the results, 41.9% apoptotic effect was detected. When the effect of resveratol on cell migration and invasion in the PANC-1 cell line was again applied by applying IC₅₀ value, it was found that it caused a delay in closure of the wound line at the 72nd hour compared to the control, preventing cell migration.

hTERT and NF- κ B gene expressions, the genes we detected in relation to telomerase, were converted to cDNA by using IC₅₀ dosed PANC-1 cell line and evaluated by RT-PCR in LightCycler 480 device. As a result, Resveratrol has been found to cause an increase in the expression level of 1.37 times in the hTERT gene and 1.55 times in the NF- κ B gene.

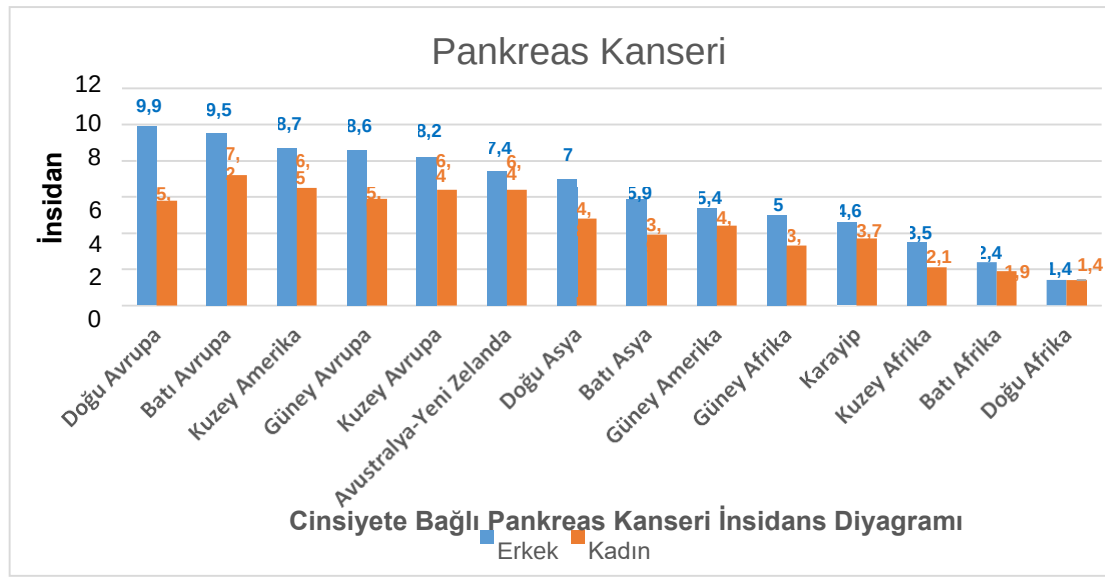
As a result, Resveratrol showed cytotoxic effect on the PANC-1 cell line, causing apoptosis. It also prevented cell migration by preventing cell migration. However, the gene expression we associate with telomerase did not decrease as we wanted. Therefore, our study requires continuity by expanding the scope of the experiment.

Keywords; Resveratrol; telomerase; hTERT; NF- KB; pancreatic cancer

1. Giriş

1.1.Araştırmanın Problemi

Dünyada her yıl milyonlarca insana pankreas kanseri teşhisi konulmakta ve bu kanser tipi kansere bağlı ölümlerde dördüncü sırada yer almaktadır (Xu ve ark., 2015). Global Sağlık Veri Değişimi (GHDx) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) havuzlarından elde edilen dünya çapındaki pankreas malignitelerine göre, 2017 yılında dünya çapında 447 665 yeni pankreas kanseri vakası (milyonda 58,6) kaydedilmiştir. Ölüm oranı ise 441 083 ölüm (milyonda 57,7) olarak belirtilmiş olup, insidans, prevalans ve mortalite son 25 yılda % 55, % 63 ve % 53 artmıştır (Lippi, Mattiuzzi, 2020). Ülkeler bazında pankreas kanserinin insidansı erkek ve kadın ayrımı yapılarak Grafik 1’de gösterilmiştir.



Grafik 1. Ülke Bazında Cinsiyete Bağlı Pankreas Kanseri İnsidans Diyagramı

Globocan veri tabanındaki her iki cinsiyette pankreas kanserinin insidans (1/100.000) diyagramı (McGuigan, 2018).

Pankreas kanserinde; lokal agresyon, sistemik tedavilere direnç ve erken metastatik yayılım en belirgin özelliklerdendir (Cartwright ve ark., 2008). Ayrıca erken evrelerde tespit edilmesi ve diğer pankreas hastalıklarından ayırt edilmesi de oldukça güçtür (Sawabu ve ark., 2004).

Pankreas kanserinde genellikle, erken tanının konulamaması ve sistemik tedaviye yeterli yanıtın verilememesi olumsuz sonuçlar doğurmaktadır. Radikal rezeksiyon tüm hastaların yalnızca % 20'si için mümkün olabilmektedir. Bu nedenle prognostik değerlendirme ve risk sınıflandırması için doğru bir evreleme sistemine ihtiyaç duyulmaktadır (Pu ve ark., 2019).

Duktal adenokarsinom pankreasın en yaygın malign tümörüdür. Büyük araştırma çabalarına, teşhis ve tedavide yapılan kademeli iyileşmelere rağmen, hala kötü bir prognoza sahiptir (Gallmeier, Gress, 2016). Şu anda tedavi seçeneği olarak Pankreatoduodenektomi (Whipple prosedürü), distal veya total pankreatektomi, tümörün veya tümörlerin anatomik konumuna bağlı olarak pankreas kanserinin rezeksiyonu için olan cerrahi seçeneklerdir (McGuigan ve ark., 2018).

Ancak hastaların çoğu cerrahi adım için uygun olmayan ileri düzeyde kanser profiline sahip kişiler olmaktadır. Neoadjuvan kemoterapi radyoterapi ile birlikte ya da yalnız başına cerrahi uygulamayı iyileştirmek için lokal ileri evreli tümörleri küçültmek için uygulanmaktadır (Raufi ve ark., 2019). Neoadjuvan tedavinin hem tümör boyutunu hem de lokal olarak ilerlemiş hastalığın derecesini azaltma kabiliyeti birçok malignite ile ilişkili tedavi sonuçlarını iyileştirmektedir. Bu yaklaşım, son 20 yılda pankreas kanseri olan hastalarda çalışılmış olup şu anda da aktif olarak araştırılmaktadır (Jutric, Melstrom, 2017).

Bu hastalığın multidisipliner tedavisi, tanıdaki kanser aşamasına (rezektabl, sınırda, lokal olarak ileri ve metastatik hastalık) bağlıdır ve cerrahi, kemoterapi, kemoradyoterapi ve destek bakımının birleştirilmesiyle mümkündür (Lambert ve ark., 2019).

İnsan kanser türlerinin gelişimine neden olan mekanizmalar oldukça karmaşık bir yapı göstermekle birlikte yaklaşık % 90'ında telomeraz aktivitesinin gözlendiği belirtilmektedir (Janknecht, 2004). Bu düzensiz telomeraz aktivitesi, tümörjenezis ve kanserin neoplastik büyümesinin teşviki ile ilişkilendirilmektedir (Newbold, 2002). İnsan telomeraz revers transkriptaz (hTERT) ekspresyonu ve telomeraz aktivitesi diğer kanser türlerinde olduğu gibi pankreas kanserlerinde de oldukça yüksektir. Bu nedenle yüksek aktif telomeraz ve hTERT ekspresyon oranı, telomeraz hedeflemesinin bu hastalığın tedavisi için ümit verici bir strateji olduğunu göstermektedir (Ohuchida ve ark., 2006).

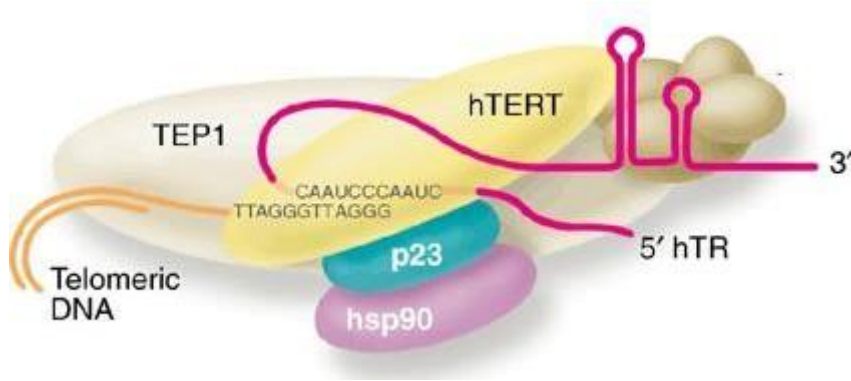
1.2.Araştırmanın Sorusu

Pankreas kanserinde (PCa) tam rezeksiyon, kemoterapi ve radyoterapiye maruz kalan hastaların sadece % 20'lik kısmı 5 yıllık yaşam süresine sahiptir (Mohammed ve ark., 2014). Sağ kalım süresinin kısa olması nedeniyle risk faktörlerinin tanımlanması ve erken tespit yöntemlerinin oluşturulması büyük önem taşımaktadır (Fogel ve ark., 2017). En son istatistiklere göre hastaların sadece % 7'si tanıdan 5 yıl sonra hayatta kalabilmektedir. Evre I veya lokalize özellik gösteren hastalarda 5 yıllık sağkalım oranı % 25'e yükselirken, bu erken evrede hastaların sadece % 9'unda tanımlanmaktadır (Raimondi ve ark., 2010).

Hayatta kalım sürelerinin bu kadar kısa olması yeni tanı ve tedavi seçeneklerine duyulan ihtiyacın altını çizmektedir. Son dönemde ilgi çeken doğal bileşikler sınıfına giren Resveratrol'ün pankreas kanseri ile ilgili klinik uygulamaları ortaya konmaya çalışılsa da PCA'da Resveratrol'ü inceleyen az sayıda klinik çalışma bulunmaktadır. PCA'nın özelliklerine ve önceki çalışmaların sonuçlarına dayanarak, Resveratrol uygulamasına dayalı bazı terapötik stratejiler önerilmektedir. Bunlardan ilki; Resveratrol'ün hücre proliferasyonunu inhibe etmesi ve apoptozu indüklemesi yoluyla tümör hacminin azaltılması için ameliyat öncesinde uygulanabilirliği. Resveratrol apoptotik bir çok yollağı etkileyerek apoptozu indükleyebilir. Şekil 1'de Resveratrol'ün apoptotik yollarla olan etkileşimi gösterilmiştir.

1.3. Araştırmanın Hipotezleri

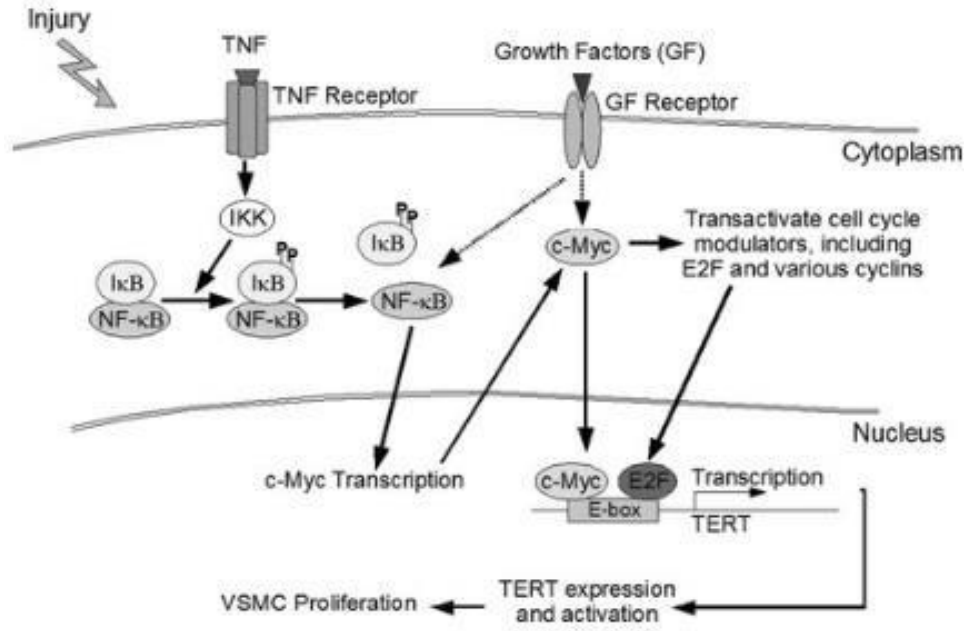
Telomeraz ; revers transkriptaz olarak işlev gören bir ribonükleoproteindir ve iki ayrı bileşenden oluşmaktadır. Bunlar; insan telomeraz revers transkriptaz (hTERT) ve RNA bileşenidir (hTER) (Daniel, Tollefsbol, 2018). Şekil 2’de telomerazın alt birimleri olan hTERT ve hTER şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2 . hTERT ve hTER alt birimleri

(Shay, 1999)

Kanser hücrelerinde hTERT'nin aşırı ekspresyonunun tümör gelişimi ve anjiyogeneze katkıda bulunduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, hala kanser hücrelerinde hTERT'nin aşırı eksprese edilme mekanizması belirsizliğini korumaktadır. Diğer yandan hTERT ekspresyonunun yüksek oranda indüklenebilir NF- κ B transkripsiyon faktörü ile düzenlenebileceğine dair kanıtlar vardır. Bu nedenle, NF- κ B ve hTERT arasındaki ilişkiyi moleküler düzeyde incelemek oldukça önemli gözükmektedir (Wang ve ark., 2004). NF-KB 'nin hTERT'i aktif hale getirmesinde görev alan yollar ve bunların birbirleri ile olan bağlantısı Şekil 3'te gösterilmiştir.



Şekil 3. TERT aktivasyonu ve yollarla bağlantısı

(Wang, Bennett, 2010).

Çeşitli araştırmalarda Resveratrol'ün kanser de dahil olmak üzere pek çok hastalığın tedavisinde kullanılabileceği gösterilmiştir. Özellikle çeşitli tümör modellerinde apoptozu uyardığı, proliferasyon ve progresyonu inhibe ettiği ayrıca yüksek dozlarda uygulandığında telomeraz aktivitesini aşağı regüle ettiği gözlenmektedir. Tüm bu çalışmalar Resveratrol'ün kanser tedavisinde ümit verici etkilerini yansıtmaktadır (Valentovic, 2018).

Kurmuş olduğumuz hipotezde Resveratrol'ün bu etkileri göz önünde bulundurularak şekillendirilmiş olup kanser hücrelerinde yeniden aktivasyon kazanan telomerazı tetikleyen gen ifadeleri üzerinde durulmuştur .

1.4. Araştırmanın Varsayımları

PANC-1 hücre hattında Resveratrol'ün hücreler üzerindeki sitotoksik etkisini değerlendirerek IC₅₀ değerinin saptanması, apoptotik, hücre migrasyon ve invazyona olan etkileri ve telomeraz aktivitesine olan etkisini görmek adına sırasıyla; sitotoksosite, apoptoz analizi, wound healing analizi ve hTERT / NF-κB gen ifadelerini

belirlemek için qPCR yöntemi uygulanmıştır. Tüm bu deneyler sonucunda Resveratrol'ün pankreas kanseri için yeni bir tedavi seçeneği olabilirliği araştırılmıştır.

1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları

Araştırmamızın yalnızca in vitro hücre kültüründe yürütülmüş olması, hasta serum, doku örneği veya in vivo çalışmaları içermemesi, ayrıca pankreas kanseri için tek bir kanser hücre hattı kullanılması ve sağlıklı pankreas hücresinin çalışmaya dahil edilmemesi araştırmamızı sınırlamış ve devamlılığını gerektirmiştir. Ayrıca in vitro hücre kültürü çalışmaları organizmadan bağımsız bir şekilde hücre flasklarında yürütüldüğü için in vivo çalışmalardan farklı sonuçlar gösterebilir. Her hücre pasajlanması, dondurulup çözülmesi gibi işlemler hücre morfolojisini değiştirebilir. Ayrıca çoklu hücre tiplerinin çalışıldığı ortamlarda veya uygun olmayan laboratuvar koşullarında kontaminasyon riski mevcuttur.

1.6. Araştırmanın Amacı

Bu tez kapsamında dünyada her yıl milyonlarca insana teşhisi konulan ve kansere bağlı ölümlerde dördüncü sırada yer alan ayrıca diğer pankreas hastalıklarından ayrımı oldukça güç olup sınırlı tedavi seçenekleri olan, pankreas duktal adenokarsinom hücre hattı PANC-1 hücrelerinde doğal bir bileşik olan Resveratrol'ün etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Resveratrol'ün kullanımına bağlı olarak kanser hücrelerinde ölümsüzlükle ilişkilendirilen telomeraz aktivitesi ve telomeraz ilişkili genler olan hTERT ve NF- κ B ifadesi ve dolayısıyla pankreas kanser gelişimindeki etkisinin araştırılması, ayrıca Resveratrol'ün PANC-1 hücre hattı üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkisinin yanı sıra hücre invazyon-migrasyonuna olan etkisinin de gözlemlenmesi amaçlanmıştır.

Bu tez Resveratrol'ün PANC-1 hücre hattında telomeraz aktivitesine olan etkisini görmek için ilişkilendirdiğimiz hTERT ve NF- κ B gen ifadelerinin değerlendirilmesi açısından yapılan tek çalışmadır. Bu nedenle hem kendimiz açısından sonraki çalışmalarımıza yön vermesi adına hemde bu kanser tipinde ve diğer kanser tiplerinde

Resveratrol'ün bu etkisinin değeriendirilmesi açısından yol gösterici olması amaçlanmıştır.

2. Genel Bilgiler

2.1. Pankreasın Yapısı ve Fonksiyonları

Pankreas makroskopik olarak baş, gövde ve kuyruk olmak üzere üç bölümden oluşan bir bezdir. Ancak bölümler arası belirgin bir sınırlanma yoktur (Suda, Nobukawa, Takase, Hayashi, 2006). Boyut ve ağırlık olarakta, pankreas 14–18 cm uzunluğunda, 2-9 cm genişliğinde ve 50-100 gr ağırlığındadır (Dolensek ve ark., 2015). Önemli bir özelliği vücudumuzdaki diğer bezlerin aksine, belirgin bir fibröz kapsül içermemesidir (Hoe ve ark., 1999). Pankreas, hem endokrin hem de ekzokrin bölümlerinden oluşan kompleks bir bezdir (Dubois, 1999). Ekzokrin pankreas bileşeni pankreas kütlelerinin ~% 90'ını oluşturmakla birlikte; asiner, sentroasinar ve duktal hücreleri içermektedir. Langerhans adacıklarının % 1-2 'sini endokrin komponentleri oluştururken geri kalan kısmı kan damarları, lenfatikler, sinirler, interstitium ve fibröz bağ dokudan oluşmaktadır (Pandiri, 2014). Ekzokrin bölümü ; su, bikarbonat iyonları ile tripsinojen, kimotripsinojen, karboksipeptidazlar, elastaz, lipaz, fosfolipaz A, amilaz, DNAz ve RNAz gibi çeşitli enzimler içeren pankreas suyunun üretiminde görevlidir. Endokrin bölümü ise çeşitli hormon üreten beş hücre tipinden oluşmaktadır: Bu hücre tiplerinden alfa hücreleri glukagon, beta hücreleri insülin, delta hücreleri somatostatin, PP (gama) hücreleri pankreas polipeptit ve epsilon hücreleri de grelin salgılamaktadır. Salgılanan hormonlar kan dolaşımı yoluyla kendi hedef organlarına ve dokularına taşınırlar. Endokrin hücre kümeleri ilk olarak Langerhans tarafından tarif edildiği için Langerhans adacıkları olarak isimlendirilmektedir (Henry ve ark., 2019).

2.2. Pankreas Kanseri

Pankreas kanseri ilk defa 1761'de İtalyan anatomist Giovanni Battista Morgagni tarafından “Sedibus Et Causis Morborum Anatomen İndagatis Libri Quinque” kitabında ifade edilmiştir (Ralph ve ark., 2014).Günümüzde hala ciddiyetini korumakta olan pankreas kanseri, Amerika Birleşik Devletleri'nde kansere bağlı ölümlerin dördüncü önde gelen nedenidir ve her yıl 45.000'den fazla hastaya pankreas kanseri tanısı konmakta ve hastaların çoğu hayatlarını kaybetmektedir (Fogel ve ark., 2017). Hastaların %80 'ine ileri seviyedeysen teşhis konulabilmektedir (Raimondi ve ark., 2010).

2.2.1. Patogenez

Pankreas kanseri endokrin veya ekzokrin hücre kaynaklı olarak ortaya çıkabilir. Bunları histolojik görünümüne göre endokrin ve ekzokrin olarak ayırt etmek mümkündür. Endokrin tümörler nispeten nadir görülür ve yaygın olarak pankreas adacık hücrelerinden türemiş olup, genellikle yapısal olarak yüksek seviyelerde pankreas hormonları üretmektedir. Ayrıca köken aldıkları hücelere ve salgıladıkları hormonlara bağlı olarak insülinom, glukagonom ve gastrinom şeklinde de sınıflandırılabilirler (Grant, Hua, Singh, 2016). Ekzokrin hücrelerinden türetilmiş pankreas kanserleri daha yaygındır. Pankreas duktal adenokarsinoma (PDAC) alt tipi, ekzokrin tümörlerin çoğunu oluşturmakta ve tüm pankreas malignitelerinin % 90'ından fazlasında gözlenmektedir. Çalışmamızda kullandığımız PANC-1 hücre hattı da bir duktal adenokarsinoma hücre serisi olduğu için tercih edilmiştir (Gandhi ve ark., 2018). Ekzokrin pankreasın PDAC dışında asinar farklılaşması olan diğer karsinomları arasında pankreatoblastomalar, asinar hücreli karsinomlar ve karışık histolojiye sahip karsinomlar bulunmaktadır (Collisson ve ark., 2019). PDAC'lar, pankreas kanalını düzenleyen ve kökenleri nedeniyle bez benzeri görünen epitel hücrelerden türetilir ve sıklıkla karaciğer veya lenf bezlerine metastaz yaparlar. Kanser gelişiminin erken evrelerinde semptom eksikliği nedeniyle, PDAC'ler genellikle kanserin metastaz oluşumundan sonra geç bir aşamada teşhis edilirler. Bu malignitenin en iyi karakterize edilen üç öncüsü, Pankreas İntraepitelyal Neoplazi (PanIN), İntraduktal Papiller Neoplazma (IPMN) ve Müsinik Kistik Neoplazmadır (MCN). PanIN, bu premalign lezyonlar içinde en yaygın olanıdır (Naqvi, Hasan, Hassan, 2017). Bu malignitelerin her biri benzersiz klinik, patolojik ve moleküler özelliklere sahiptirler (McGuigan ve ark., 2018). Prekürsör lezyonların tanınması ve moleküler karakterizasyonunun belirlenmesi oldukça önem arz etmektedir. Çünkü bu bilgiler ışığında erken tanıya gidilerek kansere bağlı ölümlerin azaltılması mümkün olabilmektedir (Feldmann, Beaty, Hruban, Maitra, 2007).

2.2.2. Evreleme, Tanı ve Tedavi

PDAC'ın patolojik değerlendirmesinde en etkili evreleme sistemi, Amerikan kanser ortak komitesi (AJCC) evreleme sistemidir. Bu sistem, tümör boyutu (T evresi), lenf

düğümlerine metastaz (N evresi) ve uzak metastazı (M evresi) içeren üç ana bileşene dayanmaktadır (Bilimoria ve ark., 2007). Ocak 2018 itibariyle, pankreasın ekzokrin bölümünden kaynaklanan tümörler için TNM evreleme sistemi de dahil olmak üzere, AJCC Kanser Evreleme El Kitabı'nın sekizinci baskısı kullanılmaktadır (Roessel ve ark., 2018).

Pankreas kanserine bağlı lezyonların tanısının konulmasında bir takım görüntüleme yöntemleri kullanılmaktadır. Bunlar; Ultrasonografi (US), bilgisayarlı tomografi (BT), manyetik rezonans görüntüleme (MRI), pozitron emisyon tomografisi (PET) ve endoskopik ultrasonografi (EUS) görüntüleme yöntemleridir (Lee, Lee, 2014). Pankreas kanserinde en temel tedavi seçeneği cerrahi rezeksiyondur (McGuigan ve ark., 2018). Tek tedavi seçeneği cerrahi rezeksiyon gibi gözüksede hastaların ancak % 20' si bunun için uygun koşullara sahip olmaktadır (Jutric, Melstrom, 2017). Küratif amaçlı cerrahi rezeksiyon geçirmiş kişilere ayrıca adjuvan ve neoadjuvan tedavi önerilmektedir. Günümüzde adjuvan tedavi olarak gemsitabin, 5-florourasil (5FU) veya 5-FU temelli kemoradyoterapi önerilmektedir (Jimenez ve ark., 2008). Adjuvanlar ile tedavi, postoperatif iyileşme sürecinden sonra gerekli BT taramaları ve başta pankreas olmak üzere çeşitli kanserlerde bir tümör belirteci olan CA19-9 (Kanser Antijen 19-9) konsantrasyonları kontrol edildikten sonra başlanmaktadır (Hidalgo, 2011).

2.3.Telomer ve Telomeraz

Telomerler, ökaryotik kromozomların uçlarında yer alan ve çok sayıda "TTAGGG" dizi tekrarı içeren heterokromatik yapılardır (Dikmen, Doğan, 2003). Ayrıca yapısında telomer-shelterin kompleksi olarak bilinen bir takım telomerik proteinlerde (TRF1, TRF2, POT1, Rap1, TIN2, ve TPP1) yer almaktadır (Oeseburg ve ark., 2010). Telomerik DNA tekrarlarına tutunan ve özel amino asit dizisine sahip olan bu proteinler, telomerik kararlılığın sağlanmasında ve telomer uzunluklarının düzenlenmesinde işlevseldir (Yıldız, Aras, Duman, 2009). Telomerler, kromozom stabilitesinin korunması, nükleer yapılanma, gen ekspresyonu, kromozomal replikasyon, tümör oluşumu, yaşlanma ve hücre bölünmesi gibi pek çok hücresel olayda görev almaktadır (Dikmen, Doğan, 2003). Omurgalı telomer yapısı, G bazından zengin 75-200 bp'lik tek bir iplikçik uzantısı olan tandem (TTAGGG) dizilerinden

oluşmakta ve G kuyruğu ile sonlanmaktadır (Oeseburg ve ark., 2010). Hücre döngüsünün mitotik olmayan aşamasında G kuyruğu, telomer shelterin kompleksinin oluşturduğu D-loop ve T-loop bölgeleri tarafından korunmaktadır (Lange, 2005). Telomerler, her hücre bölünmesinde boyları biraz daha kısalan ve boyları "sınır" kabul edilen noktaya geldiği anda da hücre bölünmesinin durmasına neden olan yapılardır. DNA polimerazın DNA'yı sadece 5'-3' yönünde sentezleyebilmesi ve replikasyonu sırasında kısa RNA primerlerinin uzaklaştırılması, geri kalan (lagging) iplikcikte tam olmayan replikasyona ve her hücre bölünmesinde telomer uzunluğunun azalmasına yol açmaktadır (Bay, Çiçek, 2007). Böyle bir durumda hücreler bölünmeyi durdurarak yaşlanma sürecine girerler (Cherif ve ark., 2003). Telomer uzunluğunun korunmasında ters bir transkriptaz enzim olan telomeraz sorumludur. Ancak insan yetişkin dokularındaki telomeraz aktivite seviyeleri, yaşla birlikte ilerleyen telomer kısalmasını önlemek için yeterli değildir (Flores ve ark., 2008). Telomeraz enzim kompleksi ; ters transkriptaz katalitik protein (telomeraz ters transkriptaz (TERT) ve telomeraz RNA bileşeni (TERC) olmak üzere iki alt birimden oluşmaktadır (Popli, Sircar, Chowdhry, 2017).

2.4.hTER ve hTERT

Bir ribonükleoprotein olan telomeraz enziminin RNA (hTER) alt bileşeni de novo telomer sentezi için kalıp oluşturmada görev almaktadır. Telomeraz RNA'sı telomer DNA tekrarının komplementer dizisini kullanarak telomer DNA'sının tek zincirinin sentezlenmesini sağlamaktadır. hTER, telomerik DNA dizisine komplementer olan 8-30 bazlık kısa bir segmenti, zincirin 3' ucunun uzatılmasında kalıp olarak kullanılmaktadır. İnsan telomeraz RNA komplementer dizisi 3' -AUCCCAAUC-5' şeklindedir (Bayramoğlu, 2006). İnsan telomeraz kompleksi RNA alt birimi (hTER), hem tümör hem de normal somatik dokularda yapısal olarak eksprese edilsede, (Kimura ve ark., 2004) hTERT normal somatik hücrelerde çok düşük miktarlarda eksprese edilir ve insan tümörlerinin çoğunda yukarı regüle edilmesi sonrasında yeniden aktive kazanarak kanser hücrelerine sınırsız çoğalma özelliği kazandırmaktadır (Mukherjee ve ark., 2011).

İnsan telomeraz revers transkriptazı (hTERT); protein yapıda olup reverse transkriptaz domain içeren telomerik DNA sentezi sırasında fosfodiester bağlarını

sentezlemektedir (Bay, Çiçek, 2007). Birçok organizmada, TERT proteini, telomeraz N-terminali (TEN) domaini, TR-bağlama domaini (TRBD), ters transkriptaz domaini ve C-terminal uzantısı (CTE) şeklinde dört fonksiyonel alan içermektedir (Schmidt, Cech, 2015). Katalitik alt ünite hTERT'in ekspresyon seviyeleri, telomeraz aktivitesi ve ömrü sınırlı olan tüm yetişkin somatik hücrelerde baskılanmış halde olup embriyonik ve pluripotent kök hücrelerde ve özellikle tüm kanserlerin % 85-90'ında mevcut olup, uzun ömür gibi ölümsüzlük özelliğinin kazanılmasını açıklamaktadır (Hannen, Bartsch, 2018).

2.5.NF-κB (Nükleer Faktör Kabba B)

Nükleer faktör κB (NF-κB), çeşitli biyolojik tepkilerin düzenlenmesinde yer alan dimerik transkripsiyon faktörü ailesidir. NF-κB, bağışıklık sisteminin düzenlenmesi ve inflamasyon şekillenmesinde anahtar rol oynamakta olup, onkogenezdaki rolü de azımsanmayacak kadar önemli olduğu bildirilmektedir (Dolcet ve ark., 2005). NF-κB, memelilerde homodimer veya heterodimer oluşturabilen, beş farklı protein (p65 / RelA, RelB, cRel, p50 ve p52) monomerinden oluşmaktadır ve bunlar DNA'ya farklı şekilde bağlanabilmektedirler (Mitchell, Vargas, Hoffmann, 2016). NF-κB 'nin aktifleşmesi; IκB inhibitör proteinin bozulması, NF-κB öncü proteinlerinin işlenmesi ve NF-κB monomer proteinlerinin indirgenmesi olaylarıyla kontrol edilmektedir (Mitchell, Vargas, Hoffmann, 2016).

2.6. hTERT, NF-κB ve Kanser İlişkisi

Telomerlerin uzaması, her hücre bölünmesi sırasında kromozom uçlarının kaybını engellemekte, yaşlanmayı önlemekte ve kanser hücrelerine sınırsız çoğalma potansiyeli kazandırmaktadır (Mukherjee ve ark., 2011). Telomerazın enzimatik aktivitesi, transkripsiyonel seviyede hTERT tarafından düzenlenmektedir. hTERT promoteri, Myc / Mad (E kutusu), Sp1, östrojen ve NF-κB dahil transkripsiyonel faktörler için bağlayıcı motifler içermekle birlikte fosforilasyonu ve nükleer translokasyonu, telomeraz aktivitesini düzenleyen ek mekanizmalardır (Akiyama ve ark., 2003). hTERT'nin aşırı ekspresyon mekanizmasının belirsizliğini korumasıyla birlikte ekspresyonu indüklenebilmektedir. hTERT'in NF-κB transkripsiyon faktörü

ile düzenlenebileceğine dair kanıtların varlığı nedeniyle hücresel düzeyde NF- κ B ve hTERT arasındaki ilişkiyi incelenmesinde yarar olduğu bildirilmektedir (Wang, Luo, Yu, 2004). Fareler ile yapılan analizlerde, hTERT'in transkripsiyonel başlangıç bölgesinden yukarı akışta, 350 baz çiftinin NF- κ B bağlanma bölgesi olduğunun bulunmasıyla, NF- κ B aktivasyonunun hTERT ekspresyonunu etkileyebileceği görüşünü destekler niteliktedir (Yin, Hubbard, Giardina, 2000). Ayrıca Arkasubhra Ghosh ve arkadaşlarının farelerle yaptıkları bir çalışmada ; NF- κ B sinyal yolağının aktifleşmesi ile telomerazın reaktif olduğu, tümör hücrelerinde sınırsız çoğalma, hücre ölümüne direnç ve transformasyon gibi özellikler kazandığı, kanserde kronik enflamasyonu sağlayan enflamatuvar hücrelerini çekmek için de elverişli bir ortam yaratıldığı gösterilmiştir (Ghosh ve ark., 2012). NF- κ B 'nin hTERT'yi indüklemeye kabiliyetinin, TERT promotörünü dolaylı ve bilinmeyen bir mekanizmayla aktifleştirdiği bildirilmektedir (Wang, Bennett, 2010). Ayrıca; hTERT'nin nükleer translokasyon mekanizması tam olarak açıklanamamasına rağmen, literatürdeki veriler, NF- κ B'nin, hTERT'nin nükleer translokasyonunu modüle ederek telomeraz aktivitesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Lanzillo ve ark., 2006).

2.7. Resveratrol

İlk kez 1939'da Takaoka tarafından *Veratrum grandiflorum* O. Loes.'den izole edilen (Pezzuto, 2019) Resveratrol (3,4',5-trihidroksi-trans-stilben), büyük çoğunlukla üzüm, çilek, yer fıstığı ve çam olmak üzere 70'in üzerinde bitkide bulunan çevresel etkiler ve patolojik etkenlere karşı bitkinin kendini koruması amacıyla ürettiği bir fitoaleksine veya bitki antibiyotigidir (Bishayee, 2009). Özellikle üzümelerde *Botrytis cinerea* enfeksiyonu, yaprak epidermisinde ve üzüm kabuğunda Resveratrol'ün özel olarak sentezine yol açmaktadır. (Catalgol ve ark., 2012). Kırmızı üzümde elde edilen kırmızı şarapta Resveratrol'ün bu denli yüksek oluşu Fransız Paradoksunu şekillendirmesiyle birçok araştırmaya konu olmuştur. "Fransız paradoksu", 1992 yılında, yüksek miktarda doymuş yağ içeren diyet tüketimine rağmen, düşük koroner kalp hastalığı (KKH) oranına sahip olan Fransız halkının epidemiyolojik verilerine dayanarak oluşturulan bir terimdir. (Catalgol ve ark., 2012). Klinik öncesi çalışmalar Resveratrol'ün kardiyovasküler hastalıkları dışında diyabet, kanser ve nörodejeneratif

hastalıklar dahil olmak üzere birçok hastalık modelinde de koruyucu etkileri olduğunu göstermektedir (Xia1, Daiber, Förstermann, Li1, 2017).

2.7.1.Resveratrol ve Kanser Terapi

Kanser kemopreventif ilaç araştırmaları sırasında, en dikkat çekici etkenlerden biri basit bir stilben olan Resveratrol olmuştur (Pezzuto, 2019). Resveratrol'ün bu kemopreventif ve kemoterapötik potansiyeli, hem in vitro hem de in vivo olarak farklı karsinogenez modellerinde gösterilmektedir (Falomir ve ark., 2016). Kapsamlı olarak yapılan in vitro çalışmalar Resveratrol'ün; hücre büyümesi, inflamasyon, apoptozis ve metastaz gibi çoklu hücre içi hedeflerinin olduğunu ortaya çıkarmaktadır (Falomir ve ark., 2016). Resveratrol, tümör büyümesini ve göçünü engellemek için tümör kaynaklı nitrik oksit sentaz ekspresyonunu önleyebilmekte ve ayrıca tümör oluşumuna yol açabilecek DNA hasarını önlemek için bir antioksidan görevi görmektedir. Ek olarak Resveratrol, araşidonik asidi, tümör hücresi proliferasyonunu destekleyen enflamatuar bileşikler olan prostaglandinlere dönüştürerek tümörigenezde rol oynadığı bilinen siklooksijenaz (COX) aktivitesini inhibe etmektedir. Kanser hücrelerinde, tümör gelişimin destekleyen genlerin transkripsiyonunu sağlayan transkripsiyon faktörleri yukarı regüle haldedir. Bugün Resveratrol'ün bu transkripsiyon faktörlerinden biri olan NF- κ B (nuklear faktör kb)'nin DNA'ya bağlanma aktivitesini azalttığını gösteren birçok çalışma mevcuttur (Carter, Orazio, Pearson, 2014). Ayrıca kanser ve telomeraz arasındaki ilişkide Resveratrol oldukça efektif gözükmemektedir. Resveratrol birçok antikanser etki göstermesine rağmen, etki mekanizmaları henüz tam olarak anlaşılamamıştır (Jiang ve ark., 2017).

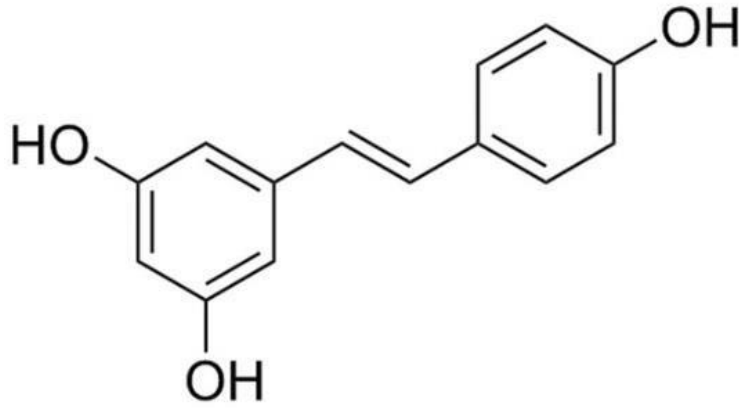
3.Gereç ve Yöntem

3.1.Reaktifler

Etken madde olarak kullandığımız Resveratrol'ün moleküler yapısı Şekil 4'te verilmiştir. Resveratrol ana stok solüsyonları Tablo 1'de gösterildiği gibi, son konsantrasyonlar elde edilecek şekilde dilüe edilerek hazırlandı.

Tablo 1. Etken madde ana stok dilüsyonu

Molekül	Molekül ağırlığı	miktarı(mg)	Stok konsantrasyon (mili-molar)	Hacim (µl)
Resveratrol -porsiyon	228.24	22.4	60	1635.7

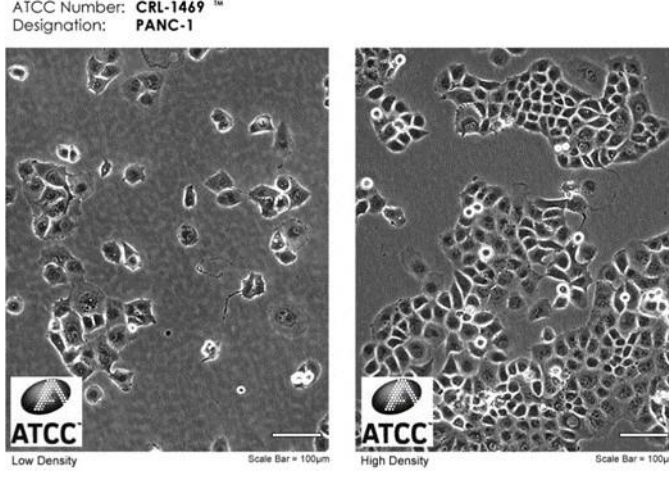


Şekil 4. Resveratrol'ün moleküler yapısı

3.2.Hücre Kültürü

Bu proje kapsamında kullandığımız insan pankreatik kanser hücre hattı olan PANC-1 Ege Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edildi. Epitelioid karsinomali 56 yaşındaki erkek hastanın pankreas duktal dokusundan elde edilmiş olan bu hücre hattı adherent özelliklere sahiptir. Hücrelerin sayılarını ikiye katlanma süresi

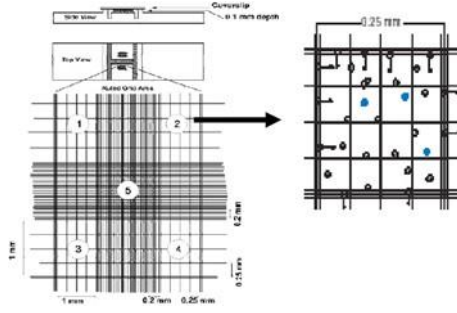
52 saattir. PANC-1 hücre hattının mikroskop altındaki görüntüsü Şekil 5'te gösterildiği şekildedir.



Şekil 5. PANC-1 hücre hattının mikroskopik görüntüsü

PANC-1 hücrelerinin uygun koşullarda üreyebilmesi için; % 10 FBS (Fetal Bovine Serum), 2mM L-glutamin, 100U/mL penisilin, 0,1 mg/mL streptomisin içeren Dulbecco's Modified Medium (DMEM) kullanılarak uygun flasklarda (25cm²'lik / 75cm²'lik) ve 37⁰C ve % 5 CO₂ koşullarını sağlayan etüvde inkübe edildi.

Hücrelerin proliferasyonu, pasajları ve takip işlemleri İnverted Mikroskop altında düzenli bir şekilde gerçekleştirildi. Hücreler kullanılmadan önce, hücre canlılık oranlarını belirlemek için Tripan Mavisi kullanıldı. 50 µl Tripan Mavisi ile 50 µl hücre solüsyonu karıştırılıp Neubauer lamında ışık mikroskobu altında hücre sayımı yapıldı ve canlılık oranları belirlendi. Membranı hasar görmüş hücreler boyayı absorbe edip mavi olarak gözükmüşken, sağlıklı canlı hücreler boyanmadığı için ışık mikroskobu altında parlak bir şekilde gözlemlendi. Neubauer hemositometresinin görüntüsü Şekil 6'da verilmiştir.



Şekil 6. Neubauer hemositometresi

3.3.Hücrelerin Pasajlanması

Yaklaşık olarak $4-5 \times 10^6$ sayıya ulaşmış ve flask yüzeyini tamamen kaplamış olan hücreler 75 cm^2 'lik flasklara pasajlandı. PANC-1 hücre hattı monolayer özelliğe sahip olduğundan pasajlanabilmeleri için ilk olarak yapıştıkları yüzeyden ayırmak amacıyla aşağıdaki süreç izlendi.

- 1.Hücreleri yüzeyden ayırmak adına tripsin-EDTA (%0,25) kullanıldığı için, öncelikle flasklardaki ortam dökülerek flaskların yüzeyi serum içermeyen ortamla yıkandı ve serum (FBS) uzaklaştırıldı.
- 2.Sonrasında flasklara 1 ml tripsin-EDTA (%0,25) solüsyonu eklendi ve tripsinin daha iyi bir etki gösterebilmesi için flasklar 37^0 C ' da 5 dk inkübatörde bekletildi.
- 3.İnkubasyon sonrası hücrelerin yüzeyden ayrılıp ayrılmadıkları inverted mikroskopla kontrol edildikten sonra, tripsin-EDTA'nın etkisini inhibe etmek için, kullanılan tripsinin yaklaşık iki katı olan 2 ml serumlu ortam flasklara eklendi.
4. Elde edilen hücreler 15 ml' lik falkon tüplerine aktarıldıktan sonra, 2000 rmp'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant dökülerek altta kalan hücre peletinin üzerine yeterli ortam eklenerek pipetaj uygulandı. Hücrelerin eşit bir şekilde dağıldığına emin olunduktan sonra iki ayrı 75 cm^2 'lik flaska bölünerek pasajlanma tamamlandı. Pasajlama sonrası elde edilen hücreler çoğalmaya bırakılarak inkübatöre kaldırıldı.

Hemen deneyde kullanılmayacak olan hücreler ise dondurularak -80^0 C 'da saklanmak üzere kaldırıldı.

3.4.Hücrelerin Dondurulması (Kriyoprezervasyon)

Pasajlanma sonrası fazla olan hücreler daha sonra kullanmak ve stok oluşturmak adına dondurularak -80°C 'da saklandı. Dondurma işlemi için aşağıdaki işlemler gerçekleştirildi.

1.Flasklardaki ortamlar dökülerek flask içi serumsuz ortamla yıkandı ve serumdan uzaklaştırıldı.

Flasklardaki hücrelere tripsin-EDTA (% 0,25) uygulanarak yüzeyden ayrılmaları sağlandı. Yüzeyden ayrılan hücreler 15 ml' lik falkon tüplerinde toplanarak 2000 rpm de 5 dk santrifüj edildi.

2.Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı. Peletin üzerine 1 ml serumlu ortam eklenerek hücreler inverted mikroskop altında sayıldı. Her kriyo tüpte yaklaşık 1×10^6 hücre olacak şekilde kriyotüp ayarlandı.

3. Buz üzerinde 9:1 oranında hazırladığımız FBS-DMSO karışımı sayıları belirlenmiş hücreler üzerine eklendi ve pipetaj yapıldı.

Pipetaj sonrası karışım kriyotüplere aktarılarak -80°C ' da saklanmak üzere kaldırıldı.

3.5.Dondurulmuş Hücre Hatlarının Çözdürülmesi

-80°C 'da kriyotüpler içerisinde sakladığımız hücreleri çözmek için oda ısısına alındı ve hücrelerin DMSO'dan zarar görmemeleri için işlemler oldukça hızlı gerçekleştirildi. Dondurulmuş hücreleri çözmek için aşağıdaki sıralama takip edildi.

1.Kriyotüpler oda ısısına alındıktan sonra 1 ml besiyeri ile pipetaj uygulanarak çözdürme işlemine geçildi.

2. Çözülen hücreler toplanarak içerisinde 10 ml besiyeri bulunan 15 ml'lik falkon tüp içerisine alındı ve 2000 rpm'de 10 dk santrifüj yapıldı.

3. DMSO'dan arındırmak için santrifüj tekrarlandı ve yeniden süpernatant dökülen tüpe 10 ml besiyeri eklenerek pipetaj yapıldı ve 2000 rpm'de 10 dk santrifüj uygulandı.

4. Santrifüjden sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve peletlerin üzerine 1 ml besiyeri koyularak pipetaj uygulandı. Hazırlanan bu hücre-besiyeri karışımındaki hücre canlılığını belirlemek için hücreler Tripan Mavisi ile boyanarak Neubauer Lamında ışık mikroskobu altında sayıldı.

5.Hücre canlılığı belirlendikten sonra, falkon içerisindeki hücrelerin üzerine 15 ml besiyeri eklenerek 75 cm²'lik flasklara ekimi gerçekleştirildi.

6.Flasklar, 37 °C' de % 95 nem ve % 5 CO₂ içeren etüve alınarak inkübasyona bırakıldı ve üremeleri takip edildi.

Hücrelerin ekilmesi sonrasındaki günlerde flasklar inverted mikroskopla takip edilerek hücrelerin çoğalma ve besiyerlerini kullanma durumlarına bağlı olarak pasajlanma yada dondurma işlemleri tekrarlandı.

3.6.PANC-1 hücre hattında proliferasyon deneyi

Proliferasyon deneyi, temel olarak proliferasyona uğrayan hücrelerin artan dehidrojenaz enzim aktivitesi ile tetrazolyumu (MTT: sarı, WST1: kırmızı) kullanarak formazan (mor) boya üretmesi sonucu görülen renk değişiminin absorbans olarak ELISA okuyucu ya da spektrofotometre ile ölçülmesine dayalıdır.

PANC-1 hücre hattında sitotoksisite deneyinde kullanılacak olan hücre konsantrasyonunu belirlemek adına proliferasyon deneyi yapıldı. 3 tekrarlı olarak kurulan deneyde her kuyuya 100 µl ortam içerisinde seri dilüsyon şeklinde 1,25x10⁴-7,81x10³ hücre/mililitre yoğunluğunda ekim yapıldı. 96. saatte durdurulan deneyde, kuyucuklara 10 ul WST-1 reaktifi eklenerek yarım saatte bir ölçüm gerçekleştirildi ve uygun absorbansa verilen hücre yoğunluğu belirlendi.

3.7.Hücre sitotoksisite deneyi (WST-1)

WST 1 (water- soluble tetrazolium-1) reaktifi kullanılarak, PANC-1 hücre hattına farklı dozlarda vermiş olduğumuz Resveratrol'ün sitotoksik etkisi değerlendirilip IC50

değeri belirlendi. Bu reaktif; hücre proliferasyonu, büyüme, canlılık ve kemosenitivitenin spektrofotometrik kantifikasyonu için kullanılmaktadır.

Çalışma prensibi temel olarak proliferasyona uğrayan hücrelerin artan dehidrojenaz enzim aktivitesini kullanarak tetrazolyum tuzları elektron alarak indirgenmekte ve formazona dönüşmektedir. Bu şekilde de canlı hücreler üzerinde renk değişimi meydana gelmektedir. Görülen renk değişiminin absorbans olarak mikropilaka okuyucuda optik dansitometri ile ölçülmesine dayalıdır.

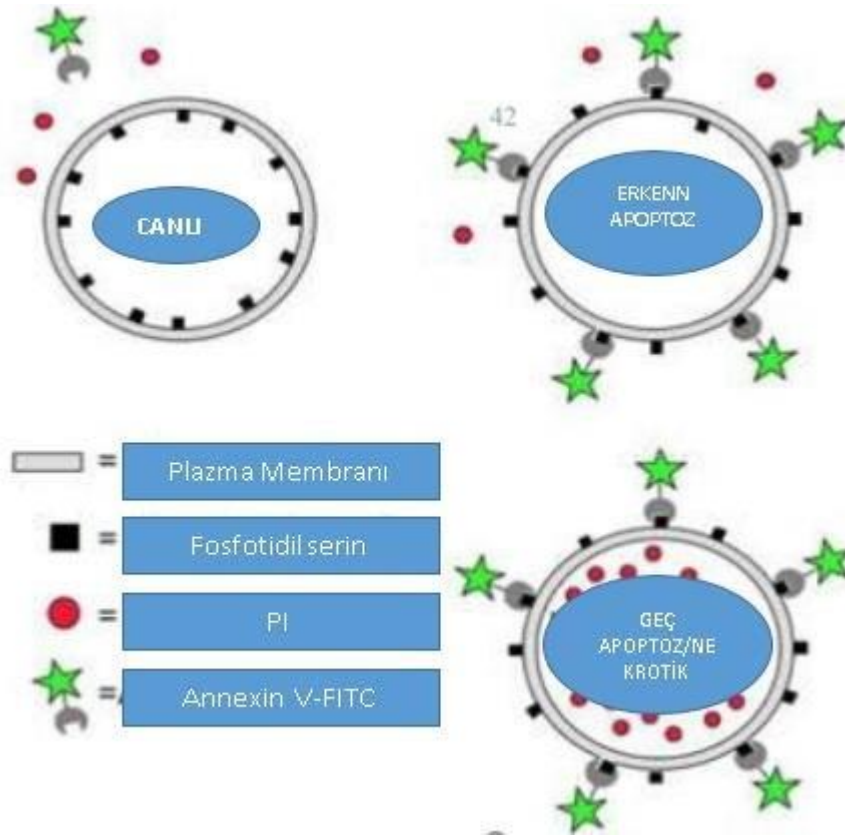
Bunun için 96'lık well platlere, 3'lü tekrarlar şeklinde her kuyuda 100 µl ortam içerisinde 4.500 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Etken maddenin eklenmesinden önce hücreler 24 saatliğine, yüzeye yapışmaları için %10 FBS içeren DMEM içerisinde bırakıldı. İnverted mikroskop altında incelemesi yapılan ve flask yüzeyine yapışmış olduğuna emin olduğumuz hücre kuyularına literatür bilgilerine dayanarak belirlenen; 200, 100, 50, 25, 12,5 µM Resveratrol içeren ortamlar eklendi. Sonrasında 24, 48 ve 72. saatlere denk gelen zaman aralıklarında kuyucuklara 10 µl WST-1 eklenerek, mikropilak okuyucuda (Multiskan Fc, Thermo) 450 nm absorbans 620 nm referans aralığında değerleri ölçüldü ve kolorometrik olarak değerlendirildi. Bunun sonucunda Resveratrol için hücre canlılığının %50'sini inhibe edici doz olan IC₅₀ değeri belirlendi.

3.8.Apoptoz Deneyi

Resveratrol'ün PANC-1 hücre hattı üzerindeki apoptotik etkisi Annexin V testi ile araştırıldı. Resveratrol verilmeyen hücreler kontrol hücreleri olarak ayarlandı.

Annexin V testinin çalışma mekanizması şöyledir; Normal bir hücrenin, hücre zarının sitoplazmik yüzünde membran lipitlerinden biri olan fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Hücrenin apoptoza girmesi durumunda hücre zarının iç yüzeyinde bulunan PS, hücre zarının dış yüzeyine geçmektedir. Bu geçiş süreci, membran bütünlüğünün bozulmadığı durumda, apoptotik hücre ölümünün erken evresinde meydana gelmektedir. Hücrenin dış yüzeyine transloke olan ve fosfatidilserine bağlanan Ca⁺² bağımlı bir protein olan AnnexinV, floresan bir madde (FITC) ile işaretlenerek apoptotik hücrenin görünür hale gelmesini sağlar. PS'nin hücrenin dış yüzeye transloke olması nekrotik ve geç apoptotik hücrelerde de meydana

gelebilmektedir. Bu nedenle erken apoptotik hücrelerin ayrımı propidium iodide (red fluorescence) boyası ile sağlanmaktadır. Bu sayede canlı hücreler (FITC-PI-), erken apoptotik hücreler (FITC+PI-) ve geç apoptotik/ nekrotik hücrelerin (FITC+PI+) birbirinden ayrımı gerçekleştirilebilmektedir. Annexin V ve PI maddelerinin hücreler üzerindeki etkisinin şematik gösterimi Şekil 7’de verilmiştir.



Şekil 7 . Hücrelerde Annexin V ve PI etkileşimleri

PANC-1 hücre hattında Resveratrol’ün apoptotik etkisini görmek için, çalışma grubuna IC₅₀ değeri uygulandı. Doz vermediğimiz grup ise kontrol grubu olarak belirlendi. 72. saatte deney durdurularak Annexin V protokolü uygulanan hücrelerde kontrole göre kıyaslama yapılarak apoptotik etkisi belirlendi.

Annexin V protokolü aşağıda belirtildiği şekilde uygulandı

Protokol;

1. Kurulan apoptoz deneyi 72. saatin sonunda sonlandırıldı.
2. 6'lık well platelerdeki ortamlar çekildi ve 1 ml PBS eklenerek yıkama yapıldı.
3. Kuyulardaki PBS çekilerek 500 µl % 0.25 tripsin eklenerek 5 dakika etüvde bekletildi.
4. Kuyulardaki hücrelerin yüzeyde ayrılıp ayrılmadığı inverted mikroskopta kontrol edildikten sonra, 1 ml % 10 FBS içeren DMEM ortam eklenerek tripsin inhibe edildi.
5. Kuyulardaki hücreler 1.5 'luk ependorfta toplanarak 2000 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı.
6. Santrifüj sonrası üstteki süpernatant döküldü. Kalan peletin üzerine 1 ml PBS eklenerek pipetaj yapılarak hücreler yıkandı ve 2000 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı.
7. Santrifüjden aldığımız ependorflara hazırladığımız 10x Binding Buffer'dan 100 µl eklendi.
8. Doz ile muamele edilmiş olan hücreleri içeren ependorflara 2,5 µl PI ve 2,5 µl Annexin V eklendi.
9. Kontrol ependorflarına ise sadece 2,5 µl Annexin V eklenerek, ependorflar 15 dk karanlık ortamda inkubasyona bırakıldı.
10. İnkubasyon sonrası, kontrol ependorfları hariç diğerlerine 150 µl Binding Buffer eklendi ve Flow cell cihazında ölçümler gerçekleştirildi.

3.9.Gen Ekspresyonu

Resveratrol için belirlemiş olduğumuz IC₅₀ değerinin PANC-1 hücre hattında, telomerazla ilişkilendirilmiş genler olan hTERT ve NF-κB'in mRNA ekspresyon düzeylerine olan etkisini incelemek adına LightCycler 480 cihazında qRT-PCR yöntemi kullanıldı.

3.9.1. Total RNA izolasyonu

IC₅₀ dozunda Resveratrol uygulanmış hücreler çalışma grubu olarak belirlenirken etken madde verilmeyen hücreler kontrol grubu olarak belirlendi. 72. saatte hücreler toplanıp, santrifüj sonrası elde edilen hücre pelletlerinden, total RNA izole edildi. İzolasyon “Total RNA Isolation Kit” protokolüne göre gerçekleştirildi.

Protokol;

1. Hücre sayısı 1×10^7 den fazla olmayacak şekilde kullanıldı ve 6'lık well platelere ekildi.
2. 24 saatlik beklemeden sonra yüzeye yapıştığına emin olduğumuz hücrelere IC₅₀ dozunda resveratrol uygulandı ve doz uygulamadığımız kuyular kontrol grubu olarak belirlendi.
3. Deney 72. saatte sonlandırıldı.
4. Platelerdeki ortam uzaklaştırılarak, serumsuz ortam ile hücreler yıkandı.
5. Eklenen serumsuz ortam çekildikten sonra kuyulara % 0.25 tripsin eklendi ve tripsinizasyon için plateler 5 dk boyunca etüvde tutuldu.
6. Hücreler flask yüzeyinden ayrıldığında kuyulara serumlu ortam eklenerek hücrelere santrifüj tüpüne toplandı ve 1200 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı.
7. Süpernatant kısmı döküldü ve elde edilen hücre peleti üzerine 100 µl PBS eklenerek süspanse hale getirildi.
8. Süspanse haldeki hücrelerin üzerine 100 µl 'Lysis-binding Buffer' eklendi ve pipetaj uygulandı.
9. Örnekler oda sıcaklığında 10-15 dakika inkübe edildi.
10. Magnapure Compact LC cihazına örnekler yüklendi. Protokol olarak ; 'RNA cell' seçildi ve 200 µl örnek, 50 ul elution volüm seçeneği işaretlendi.
11. İnkubasyon işleminden sonra elde edilen 200 µl hücre lizati barkodsuz tüplere aktarıldı ve cihazın S sırasına yerleştirildi.

12. Boş elution tüpleri cihazın E sırasına yerleştirildi.
13. Cihazın C sırasına ise her bir örnek için barkodsuz sample tüplerine 20 µl DNAaz enzimi konularak yerleştirildi.
14. Tüm basamaklar tamamlandıktan sonra cihaz başlatıldı ve 32 dakika sonra total RNA izolasyon tamamlandı.

3.9.2.RNA miktar ve saflık ölçümü

Elde edilen RNA izolasyon örneklerinin konsantrasyonu ve saflıkları 260/280nm ve 230/260nm dalga boylarında absorbanslarının ölçülmesi ile belirlendi. Ölçümler her bir örnekten 1-1,5 ul kullanılarak Nanodrop cihazında gerçekleştirildi.

3.9.3.Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Total RNA İzolasyonu sonucu elde ettiğimiz uygun RNA’lardan cDNA sentezi yapmak için “GENECOPOEIA QP057 SureScript™ First-Strand cDNA Synthesis Kit” i kullanıldı.

Aşağıdaki protokol adımları izlenildi.

Protokol;

- 1.Total RNA izolasyonu sonucu elde ettiğimiz örnekler kit manueline göre 200 ng/µl şeklinde ayarlandı.
2. Kit protokolünde belirtildiği gibi reaksiyon miksi buz üzerinde 8 µl olacak şekilde hazırlandı. cDNA oluşturulması aşamasında kullanılan bileşenler ve miktarları Tablo 2’de gösterildi.

Tablo 2. cDNA reaksiyon miks karışımı

Reaktifler	Hacim
Random Primer (50 uM)	1 µl
dNTP Mixture(10 mM each)	1 µl
5X first –strand Buffer	4 µl
M-MuLV Reverse Transcriptase (200 U/ul)	1 µl
Rnase Inhibitör (40U/ul)	1 µl

3. Miks cDNA tüplerine dağıtıldıktan sonra total Rna’lar eklenerek total hacim Rnase free dH₂O ile 20 µl’ye tamamlandı.İşlemlere buz üzerinde devam edildi.

4. Hazırlanan tüpler PCR thermo-cycler cihazına alınarak, aşağıdaki protokole göre çalıştırıldı.

1) 55 C’da 60 dk

2) 70 C’da 10 dk

5. Cihaz tamamlandıktan sonra cDNA örnekleri buz üzerinde bekletilerek PCR aşamasına geçildi.

3.9.4. qPCR Analizi

Elde edilen kalıp cDNA örnekleri kullanılarak genlerin ekspresyon seviyelerini belirlemek için ‘BlazeTaq™ SYBR Green qPCR Mix 2’ ile qPCR Array çalışması gerçekleştirildi. Hedef gen primerleri (hTERT ve NF-KB) ve house keeping gen primeri (GAPDH) ile birlikte aşağıdaki tabloda belirtilen prosedüre uygun mix hazırlandı. qPCR analizinde kullanacağımız gen primerlerinin baz dizilimi ve baz sayıları Tablo 3’te verilmiştir. GAPDH primerinin kullanım bilgileri Tablo 4’te, hTERT primerinin kullanım bilgileri Tablo 5’te, NF-KB gen primerinin kullanım bilgileri Tablo 6’da verilmiştir. PCR için kullandığımız bileşenler ve miktarları Tablo 7’de , PCR programının protokolü ise Tablo 8’de verilmiştir.

Tablo 3. Kullanılan gen primerlerinin dizilimi ve baz sayıları

Gen Primerleri		BP
GAPDH-Forward	5'- ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'	20 bp
GAPDH-Reverse	5'-TCCACCCTGTTGCTGTA-3'	17 bp
hTERT-Forward	5'-CGGAAGAGTGTCTGGAGCAA-3'	20 bp
hTERT-Reverse	5'-GGATGAAGCGGAGTCTGGA-3'	19 bp
NF-KB-Forward	5'GCAGATGGCCCATAACCTTCA-3'	20 bp
NF-KB-Reverse	5'CACCATGTCCTTGGGTCCAG-3'	20 bp

Tablo 4 . GAPDH Primer kullanım bilgisi

GAPDH-F							
Olgo No	191023-1-16	GC	42,30%	Tm(Basic)	53,83 °C	Total nmol	43,69 nmol
Skala	50 nmol	MW	5990,94	Conc	934,73 ng/μl	Total ng	261724,60 ng
Saflaştırma	DSLT	A260	29,40	OD	8,2	100 μm stok-μl TE	436,9
GAPDH-R							
Olgo No	191023-1-17	GC	40,90%	Tm(Basic)	47,05 °C	Total nmol	38,05 nmol
Skala	50 nmol	MW	5112,37	Conc	694,75 ng/μl	Total ng	194529,43 ng
Saflaştırma	DSLT	A260	20,50	OD	5,7	100 μm stok-μl TE	380,5

Tablo 5 . hTERT Primer kullanım bilgisi

hTERT-F							
Olgo No	191023-1-18	GC	42,30%	Tm(Basic)	53.83 °C	Total nmol	33,67 nmol
Skala	50 nmol	MW	6231,12	Conc	749,40 ng/µl	Total ng	209832,74 ng
Saflaştırma	DSLIT	A260	24,60	OD	6,9	100 µm stok-µl TE	336,7
hTERT-F							
Olgo No	191023-1-19	GC	44,00%	Tm(Basic)	53.25 °C	Total nmol	37,19 nmol
Skala	50 nmol	MW	5957,94	Conc	791,30 ng/µl	Total ng	221563,74 ng
Saflaştırma	DSLIT	A260	26,10	OD	7,3	100 µm stok-µl TE	371,9

Tablo 6 . NF-KB Primer kullanım bilgisi

NF-KB							
Olgo No	191023-1-20	GC	42,30%	Tm(Basic)	53.83 °C	Total nmol	37,55 nmol
Skala	50 nmol	MW	6061,99	Conc	812,88 ng/µl	Total ng	227605,12 ng
Saflaştırma	DSLIT	A260	25,50	OD	7,1	100 µm stok-µl TE	375,5
NF-KB							
Olgo No	191023-1-21	GC	46,20%	Tm(Basic)	55.88 °C	Total nmol	35,73 nmol
Skala	50 nmol	MW	6068,98	Conc	774,53 ng/µl	Total ng	216868,44 ng
Saflaştırma	DSLIT	A260	23,20	OD	6,5	100 µm stok-µl TE	357,3

Tablo 7. PCR reaksiyon karışımı

Reaktifler	Hacim
cDNA örneği	1 ul
2× Plus SYBR	10 µl
Upstream Primer	0,5 µl
Downstream Primer	0,5 µl
ddH ₂ O	8 µl
Son hacim	20 µl

- Kullanacağımız gen primerleri kullanım protokollerine uygun olarak hazırlandı.
- Üç tekrar olacak şekilde hesaplamalar yapıldıktan sonra,
- PCR reaksiyon karışımı iyice karıştırılıp PCR reaksiyon tüplerine aktarıldı.
- Kısa bir santrifüjden sonra örnekler 96 kuyucuklu plaklara alındı. 96 kuyucuklu plaklar zaman kaybedilmeden Roche Light Cycler 480 cihazına yerleştirilerek reaksiyon başlatıldı. PCR reaksiyonunu aşağıdaki şekilde programlandı. PCR programı Tablo 8’de belirtildi.
- Program bitişi sonrası elde edilen Ct değerleri değerlendirmeye alındı.

Tablo 8. PCR reaksiyon programı

Programlar	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı	Ramp Rate (°C/s)
Pre-İnkübasyon	95 ⁰ C	10 dakika	1	4.40
Pre-Amplifikasyon	95 ⁰ C	10 saniye	10	4.40
	60 ⁰ C	20 saniye		2.20
	72 ⁰ C	10 saniye		4.40
Amplifikasyon	95 ⁰ C	10 saniye	45	4.40
	60 ⁰ C	20 saniye		2.20
	72 ⁰ C	10 saniye		4.40
Melting curve	95 ⁰ C	15 saniye	1	4.40
	60 ⁰ C	1 dakika		2.20
	95 ⁰ C	-		-
	60 ⁰ C	15 saniye		2.20
Soğutma	40 ⁰ C	1 saniye		2.20

3.10.Wound Healing Deneyi

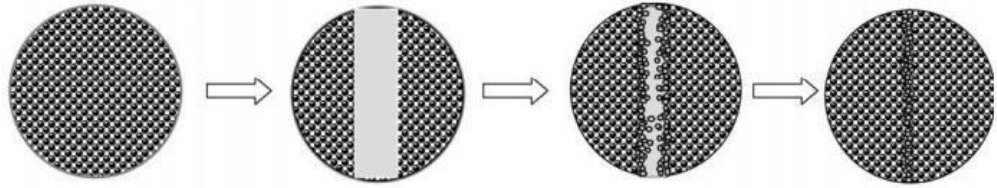
Wound healing Analizi, in vitro ortamda hücre göçünü incelemek için geliştirilen bir analiz yöntemidir. Basit olarak in vivo yara iyileşmesi sırasındaki hücre göçünü taklit ederek hücre invazyonu ve migrasyonu açısından bilgi verir. Ekstra bir malzeme gerektirmemesi ve ucuz bir in vitro yöntem olması nedeniyle hücre kültürü çalışmalarında oldukça tercih edilen bir yöntemdir.

Analizde, tek tabaka halinde olan hücrede belirli bir hat boyunca yara oluşturulur. Yara oluşmasını takiben 0, 24, 48 ve 72. saatler baz alınarak farklı zaman dilimlerinde yara oluşturulan kısımdaki hücre miktarının artışı gözlemlenerek, yaranın kapanması için gerçekleşen hücre göçünün hızı görüntüleme işlemiyle takip edilir.

Protokol;

1. Deneyde kullanacağımız hücre sayısı hesaplandıktan sonra inverted mikroskop altında hücreler sayılarak ekim işlemine geçildi.

2. Deney için 6'lık well tercih edildi ve yara hattı oluşturmak için 100'lük pipet ucu kullanıldı.
3. 6'lık well platlerde doz ve kontrol kuyuları oluşturuldu. IC₅₀ dozu uygulanan grup çalışma grubu olurken etken madde vermediğimiz grup kontrol grubu olarak belirlendi. Her kuyuda 2 ml ortam içerisinde 5×10^5 hücre olacak şekilde ayarlandı.
4. Hücrelerin plate yüzeyine yapışması için 24 saat beklenerek inverted mikroskopta yapışmaları kontrol edildikten sonra hücreler üzerindeki serumlu ortam çekildi.
5. Kuyucuklara belirli bir hat boyunca pipet ucu yardımıyla bir yara dokusu oluşturuldu. Yara dokusunun düz bir hat şeklinde olmasına dikkat edildi. Yara hattı oluştururken Şekil 8'de gösterildiği gibi bir yara hattı hedeflemesi yapıldı.



Şekil 8. Wound Healing deneyinde yara hattının oluşturulması

(Eccles ve ark., 2005)

6. Bu kısımda plate yüzeyinden ayrılan hücreleri yıkamak adına 1 ml PBS kullanıldı. İşlem iki kez tekrarlandı.
7. PBS yıkamasından sonra kuyucuklara çalışma grubu için IC₅₀ dozunu içeren ortam, kontrol grubu için de etken madde içermeyen ortam eklendi. Sonrasında 0. saat için ilk görüntülemesi yapıldı.
8. Görüntüleme işlemleri 24, 48 ve 72. saatte yapılarak yara iyileşmesi ve hücre göçü doz ve zamana bağlı olarak takip edildi .

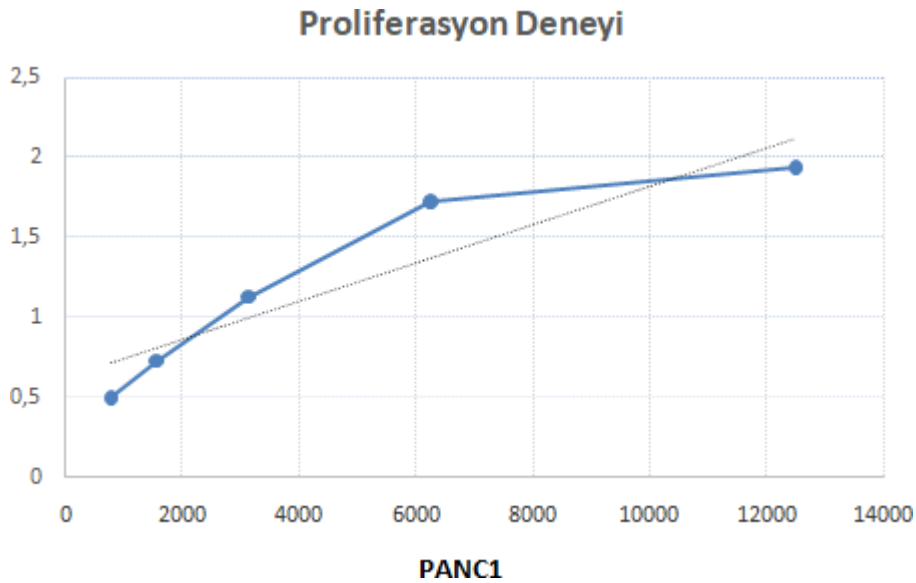
3.11.İstatistiksel Analiz Yöntemleri

IC₅₀ dozunun hesaplanması, apoptoz sonuçları ve wound healing deneyi sonuçları GraphPad Prism 8 programında hesaplandı. Real-time PCR verileri relative ekspresyon analizi $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi ile hesaplandı.

4.Bulgular

4.1. Proliferasyon Deneyi

PANC-1 hücre hattının sitotoksosite testinde kullanılacak ve uygun absorbans değerini verecek miktarını saptamak için proliferasyon deneyi yapıldı. 3 tekrarlı olarak kurulan deneyde her kuyuda 100 µl içerisinde seri dilüsyon şeklinde $1,25 \times 10^4$ - $7,81 \times 10^3$ hücre/mililitre yoğunluğunda ekim yapıldı. 96. saatte deney sonlandırılarak kuyucuklara 10 ul WST-1 reaktifi eklendi ve yarım saatte bir ölçüm yapıldı. Ölçümler Multiskan FC (Thermo) mikropalak okuyucusunda gerçekleştirildi. Sonuç olarak istenen absorbans değerini veren hücre konsantrasyonu $4,5 \times 10^3$ hücre/mililitre olarak hesaplandı. Analizin hesaplama grafiği, Grafik 2’de belirtildi.

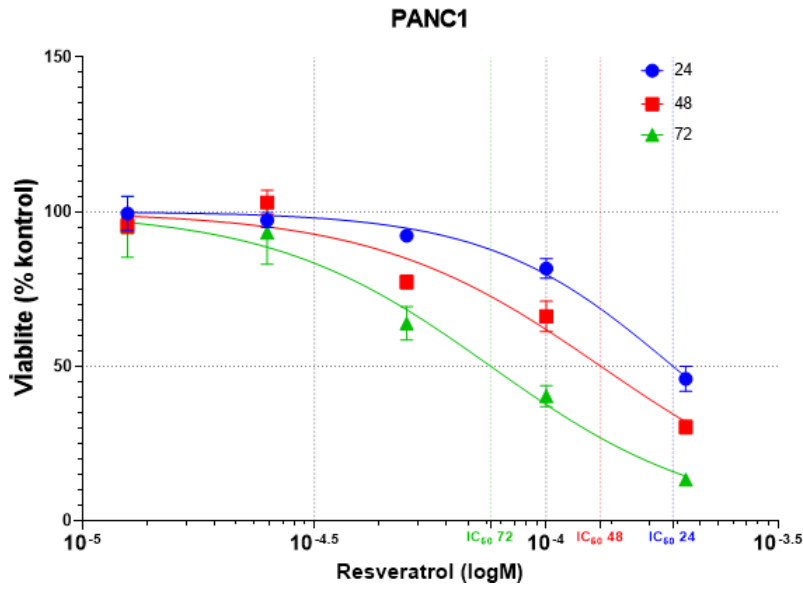


Grafik 2. PANC-1 hücre hattında proliferasyon deneyi

4.2. Resveratrolün hücre canlılık miktarlarına etkisi

96’lık well platede 3 tekrarlı olacak şekilde kurulan deneyde kuyucuklara, Resveratrol konsantrasyonları 12,5, 25, 50, 100 ve 200 µM şeklinde uygulandı. Etken madde vermediğimiz kuyucuklar ise kontrol grubu olarak ayarlandı. Proliferasyon deneyi ile saptadığımız değer sonucunda, her kuyuda 100 µl %10 serum içeren DMEM ortamı

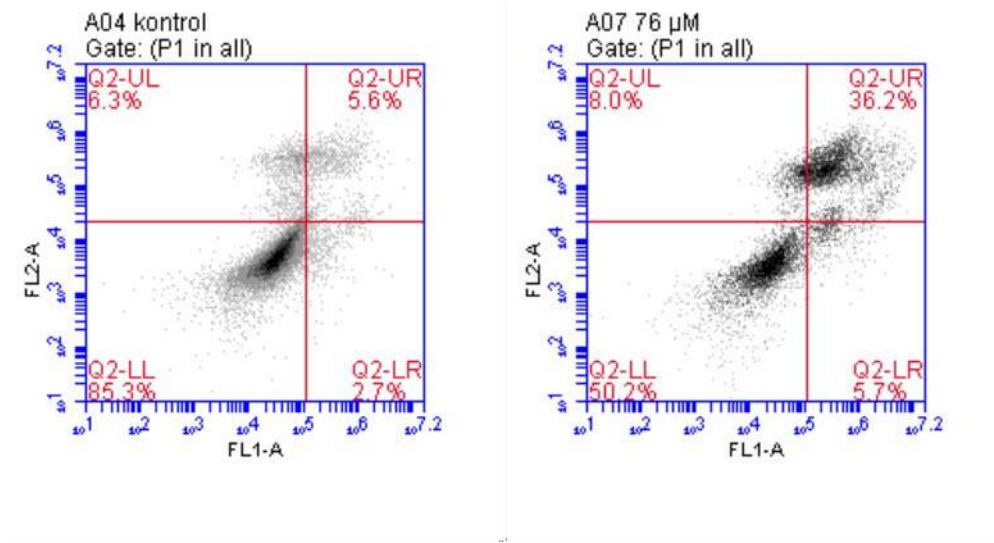
içerisine 4.500 PANC-1 hücresi ekildi. Sitotoksik etkiyi saptamak adına; 24, 48 ve 72. saatlerde her kuyucuğa 10 µl WST-1 reaktifi eklenerek absorbans miktarları ölçüldü. Deney sonuçları GraphPad Prism 8 yazılımı ile değerlendirildi. Sonuç olarak etken maddenin hücre proliferasyonunu % 50 olarak azalttığı doz miktarı olan IC₅₀ dozu 72. saatte 75,80 µM olarak hesaplandı. Analiz grafiği, Grafik 3'te belirtildi.



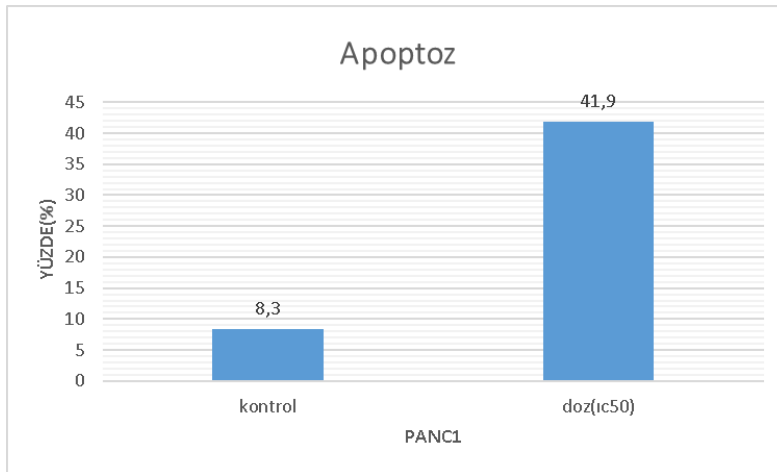
Grafik 3. PANC-1 Hücre Hattında Sitotoksiste analizi (IC₅₀ değeri)

4.3. Resveratrolün hücreler üzerindeki apoptotik etkisi

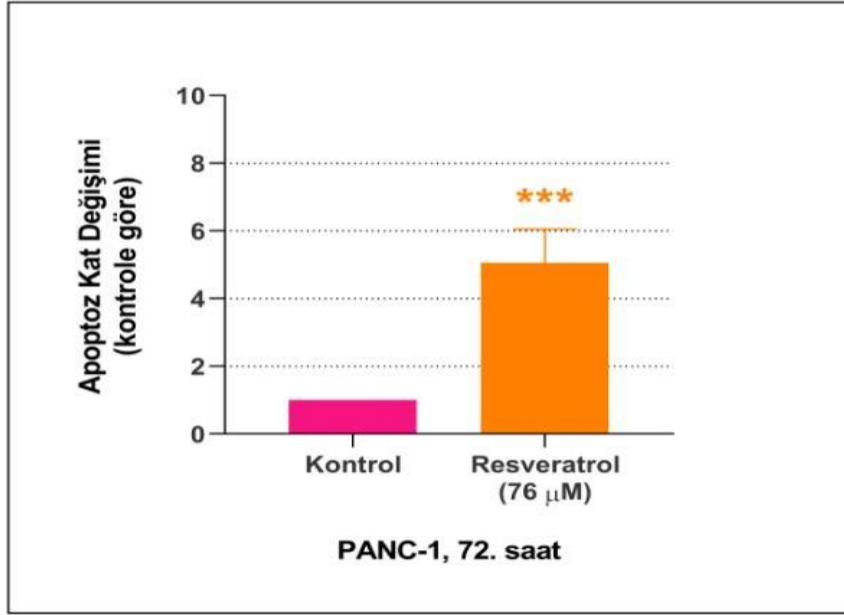
Sitotoksiste analizi ile belirlediğimiz Resveratrol IC₅₀ dozunun PANC-1 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi 72. saatte değerlendirildi. 6'lık well platelerde kurduğumuz deneyde kuyucuklarda 3 ml serumlu ortam içerisinde 5 x10⁵ hücre olacak şekilde ayarlandı. Etken madde vermediğimiz kuyucuk kontrol grubu olarak kabul edildi. Apoptoz analizi Annexin V yöntemi ile gerçekleştirildi. Sonuç olarak etken madde verdiğimiz grup kontrolle kıyaslandığında % 41,9 oranında apoptotik etki gözlemlendi. Annexin V görüntüleri Şekil 9'da, apoptoz etkisinin kontrole göre yüzde değişiminin değerlendirilmesi Grafik 4'te, kat değişimleri ise Grafik 5'te belirtildi.



Şekil 9. Resveratrol'ün (IC_{50}) PANC-1 hücre hattında 72. saatteki apoptotik etkisinin Annexin V sonuçları



Grafık 4. Resveratrol'ün (IC_{50}) PANC-1 hücre hattında 72. saatteki apoptotik etkisinin yüzde değişimleri

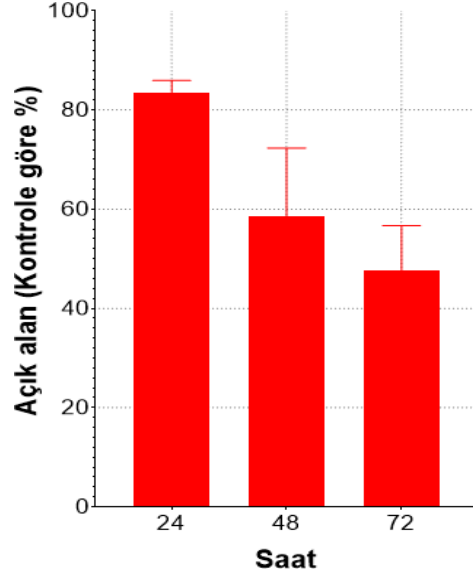


Grafik 5. Resveratrolün (IC_{50}) PANC-1 hücre hattında 72. saatteki apoptotik etkisinin kat değişimleri (***) $p < 0,001$)

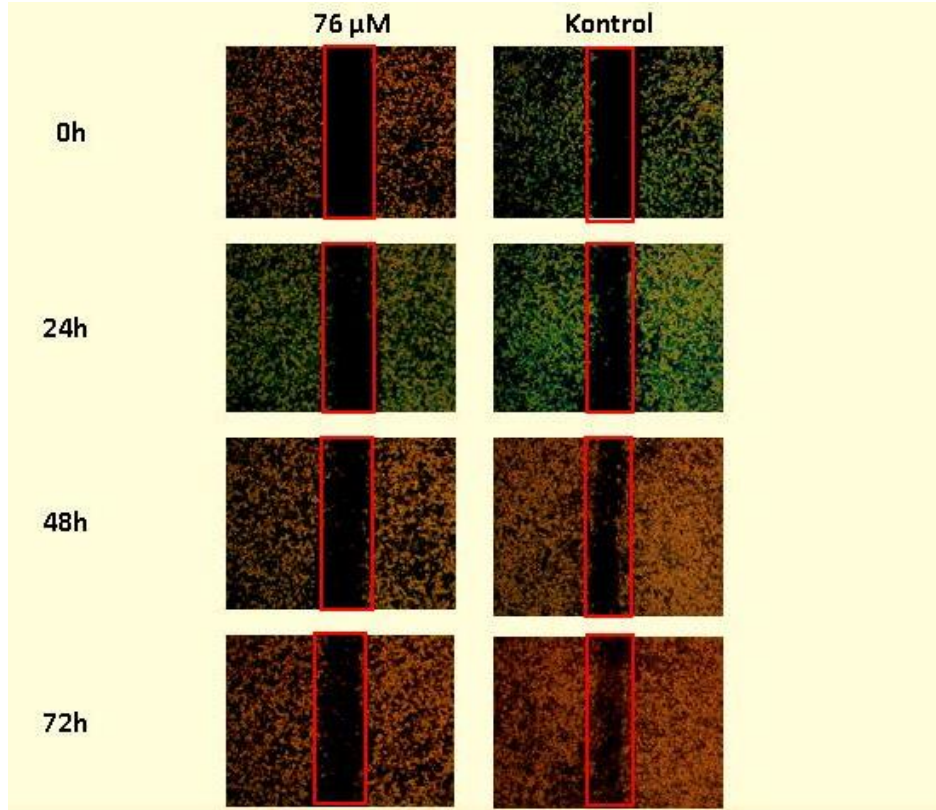
4.4. Wound healing Analizi

PANC-1 hücre serisinde Resveratrol'ün in vitro ortamdaki hücre göçüne olan etkisini incelemek amacıyla gerçekleştirdiğimiz deneyde Resveratrol'ü saptamış olduğumuz IC_{50} dozu şeklinde uygulayarak; 0, 24, 48 ve 72. saatlerdeki hücre göçüne olan etkilerini gözlemledik. 6'lık well platede kurulan deney 3 tekrarlı olacak şekilde kuruldu. Her kuyuda 3 ml serumlu ortam içersine 5×10^5 PANC-1 hücresi ekilerek deney planı gerçekleştirildi.

Çalışma grubuna IC_{50} dozu uygulanırken, etken madde vermediğimiz grup kontrol gurubu olarak ayarlandı. Sonuç olarak etken madde IC_{50} dozu verilen grupta, zamana bağlı olarak artan hücre göçü tespit edildi. Deneyin 72. saat bulguları kontrol ile kıyaslandığında % 47 oranında hücre göçünün engellenmiş olarak yara hattının kapanmasında gecikme olduğu tespit edildi. Ancak sonuçlar anlamlı değildi. Saat aralıklarına göre kapanma yüzdeleri Grafik 6'da gösterildi. Yine saat aralıklarına göre inverted mikroskop altında çekilen migrasyon görüntüleri Şekil 10'da gösterildi.



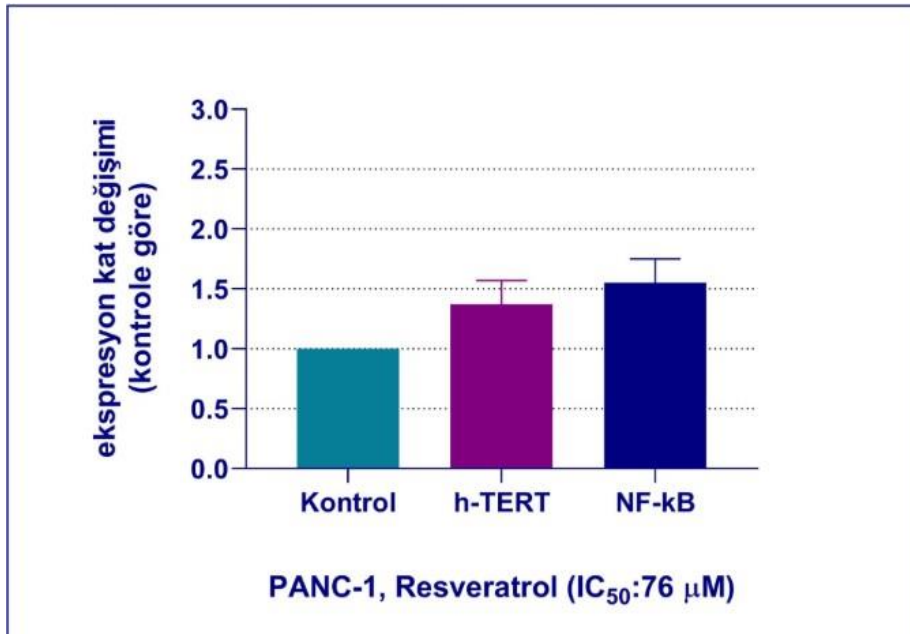
Grafik 6. Wound healing analizi 24, 48, 72 saatlerin kontrole göre kapanma yüzdeleri



Şekil 10. Hücre migrasyon görüntüleri (0, 24, 48 ve 72h)

4.5. Etken maddenin hTERT ve NF-κB genlerindeki mRNA ekspresyon düzeylerine etkisinin analizi

Resveratrol IC₅₀ dozunun 72. saatte, hTERT ve NF-κB genlerinin mRNA ekspresyon düzeylerini nasıl etkilediğini incelemek adına LightCycler 480 cihazında qRT-PCR yapıldı. Etken madde verilmeyen grup kontrol grubu olarak belirlendi. Referans olarak GAPDH house keeping geni kullanıldı. Yapılan analizler sonucu doz uygulananlarda kontrol gruplarına göre ekspresyon seviyelerinde; hTERT geninde 1,37 kat, NF-κB geninde ise 1,55 kat artış gözlemlendi. Gen ekspresyon değişiklikleri, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile hesaplandı. RT-PCR sonucuna göre belirlenen kat değişimleri Grafik 7’de verildi. PCR sonucu elde edilen verilere göre kat değişiminin hesaplaması Tablo 9’da verildi.



Grafik 7. Resveratrol IC₅₀ dozunun hTERT ve NF-κB mRNA ekspresyon seviyelerindeki kat değişimleri

Tablo 9 . GAPDH ‘a göre normalize edilen genlerde kat değişiminin hesaplanması

	Ct-Ort	DCt	2^{-ΔΔCT}	FC
Kontrol GAPDH	14,81	-	-	-
Kontrol hTERT	25,63	10,82	0,000553	-
Kontrol NF-KB	22,2	7,39	0,005962	-
				-
Çalışma grubu GAPDH	16,2	-	-	-
Çalışma grubu hTERT	26,57	10,37	0,000756	1,37
Çalışma grubu NF-KB	22,95	6,75	0,009291	1,55

5.Tartışma

Kanser dünya çapında en sık karşılaşılan ölüm nedeni haline gelmiştir ve bunlardan meme, pankreas ve prostat kanseri en sık karşılaşılan kanser vakalarıdır. Meme ve prostat kanseri, sırasıyla kadınlarda ve erkeklerde en sık teşhis edilen kanser tipleridir, pankreas kanseri ise kansere bağlı ölümlerin dördüncü nedeni olup tedavisi en agresif olan kanserlerden biridir (Thipe ve ark, 2019).

Pankreas kanseri dünyada en yaygın görülen kanser sıralamaları yapıldığında 14. sırada yer alırken, kansere bağlı ölümler düzeyinde bakıldığında ise 7. sırada yer almaktadır. Globocan veritabanı tahminlerine göre, 2018 yılında dünya çapında 458.918 pankreas kanseri tanısı ve 432.242 ölüm olduğu ortaya konmuştur (Global Cancer Observatory 2018).

İnsidans değerlendirmesi yapıldığında ülkeler arasında oldukça belirgin farklılıklar görülmektedir. En yüksek insidans Avrupa ve Kuzey Amerika'dayken, en düşük insidans Afrika ve Güney Orta Asya'dadır (McGuigan, 2018).

Amerika Birleşik devletlerinde ise 2030 yılına kadar pankreas kanserine bağlı ölümlerin 4. sıradan 2. sıraya yükseleceği tahmin edilmektedir (McGuigan, 2018).

Pankreas kanserinde erken tanı oldukça güçtür. İlk tanı konulduğunda genelde metastatik bir durum söz konusudur. Hastaların yalnızca % 9,7 sinde kanser lokal halde bulunmaktadır (Zhang, Sanagapalli, Stoita, 2018).

Pankreas kanser tipleri içerisinde, Pankreas duktal adenokarsinom (PDAC), vakaların yaklaşık % 80'ini oluşturan pankreasın en sık karşılaşılan primer tümörü ve (Al-Hawary ve ark, 2013) en ölümcül olan formudur (He, Yuan, 2014). Duktal adenokarsinom ve varyantları pankreas malignitelerinin % 90 'ından fazlasını oluşturur. Bu hastalığın semptomatik özellikleri, kilo kaybı, sarılık, emilim bozukluğu, ağrı, dispepsi ve bulantı şeklinde kendini göstermektedir. Ancak hastaların çoğu asemptomatiktir ve pankreas kanserini erkenden tespit edecek herhangi bir belirti vermemektedir (Zhang, Sanagapalli, Stoita, 2018).

Küratif amaçlı rezeksiyon ve adjuvan kemoterapi, mevcut bakım standardını temsil eder. Cerrahi tedavide önemli iyileşmelere ve son yıllarda daha güçlü rejimlerle yoğunlaştırılmış adjuvan tedaviye rağmen pankreas kanseri yüksek nüks riski olan olumsuz bir prognoza sahiptir (Seufferlein, Ettrich, 2019). Bu nedenle yeni tedavi seçeneklerinin arayışı kaçınılmaz hale gelmektedir.

Doğal bileşikler son zamanlarda, kanser de dahil olmak üzere iltihap kaynaklı hastalıklara karşı güçlü etkileri nedeniyle büyük ilgi görmektedir. Klinik öncesi, klinik ve epidemiyolojik çalışmalar dahil olmak üzere önemli miktardaki araştırmalar, tahıllarda, bakliyatlarda, sebzelerde ve meyvelerde yüksek seviyelerde bulunan polifenol içerikli diyet tüketiminin, kanser dahil bir dizi hastalığın gelişmesini önleyebileceğini göstermektedir (Ko ve ark., 2017).

Fitoöstrojenler gibi fitokimyasalların, normal hücreler üzerinde toksik etki göstermediği veya minimal toksisite göstererek, birden fazla hücrel sinyal yolunu modüle ettiği bir çok çalışmada bildirilmiştir. Bunlardan biri, non-flavonoid bir polifenol, türevi olan Resveratrol'dür (3,4', 5-trihidroksi- trans-stilbene). Resveratrol; Yer fıstığı, üzüm, çam ve çilek dahil birçok bitki türünde doğal olarak bulunan ve patojen enfeksiyonlarına yanıt olarak yardımcı olan bir fitoöstrojendir. Resveratrol, anti-oksidan, anti-enflamatuvar, kardiyoprotektif ve anti-kanser özelliklerine sahip olup, kanser hücrelerinde çoklu ilaç direncini tersine çevirebildiği ve diğer ilaçlarla birlikte kullanıldığında kanser hücrelerini standart kemoterapötik ajanlara duyarlı hale getirebileceği bildirilmiştir (Ko ve ark., 2017).

Pankreas kanseri ve diğer kanser tipleri üzerinde de yapılan pek çok Resveratrol uygulaması mevcuttur ve bu çalışmalar halen devam etmektedir. Bunlar tez kapsamında ki projemizde bize yol gösterici olmuştur.

Telomeraz, hem embriyonik kök hücrelerde hem de normal kök hücrelerden (örn., Erkek germline spermatocytes) türetilmiş progenitor hücrelerde çoğalma potansiyelinin yanı sıra genom stabilitesinin korunmasına yardımcı olmakta ancak insan dokusunun büyük çoğunluğunu oluşturan somatik hücrelerde sessiz bir tavır sergilemektedir. Normal somatik hücreler böylece replikatif yaşlanmaya girmekte, büyüme durmakta veya apoptoz şekillenmektedir. Sporadik olarak, bazı hücreler bu

hücresel kontrol noktalarından kaçarak sınırsızca büyümeye devam edebilmektedir. Bu hücrelerde telomeraz ekspresyonu ile karakterize olan telomer uzunluğunun korunduğu gözlenmektedir (Popli, Sircar, Chowdhry, 2017).

Telomerler ve telomeraz, kanser hücrelerinin ölümsüzlüğüne dahil olmaları nedeniyle antikanser terapötiklerinin gelişimi için cazip hedefler haline gelmiştir (Schränk ve ark., 2018). Telomeraz, kanser hücrelerinin %85'inde aktif haldeyken sağlıklı hücrelerde pasif haldededir. Bunun tespit edilmesinden bu yana telomeraz aktivitesini yok eden inhibitör arayışları hız kazanmıştır (Zvereva ve ark., 2010).

Telomeraz aktivitesini module eden bir çok etken vardır ve bunlardan en önemli temel birimlerden biri olan insan telomeraz ters transkriptaz (hTERT) katalitik alt birimidir. hTERT düzeyindeki artışlar doğrudan telomeraz aktivitesini devreye sokar. Bu nedenle telomerazla ilgili yapılan çalışmalarda özellikle alt birimleri olan hTERT ve hTER üzerinde durulmakta ve araştırılmaktadır.

hTERT genin ifadesi, hem transkripsiyon seviyesinde hem de Akt kinaz tarafından fosforilasyon yoluyla düzenlenir. Ayrıca, telomer dizilerinin uzamasını desteklemek için hTERT'nin nüklear lokalizasyonu gereklidir. Bu nedenle bu yollar üzerinde durularak hTERT inhibisyonu aracılığıyla telomeraz aktivitesinin ortadan kaldırılması mümkün olabilir. hTERT'in nuklear translokasyonu hala tam olarak bilinmemektedir. Ancak NF- κ B ile olan ilişkisine dair yapılan çalışmalar, NF- κ B'nin nuklear translokasyonda etkili olduğunu göstermektedir.

Akiyama ve arkadaşları, Multiple myelom hücresi olan MM.1S hücre hattında, NF- κ B ile doğrudan etkileşime giren hTERT 'in,Tümör Nekroz Faktör α (TNF- α) 'nın indüklemesiyle sitoplazmadan çekirdeğe doğru transloke olmasıyla telomeraz aktivitesini module ettiğini tespit etmişlerdir. Bu etkiyi ortadan kaldırmak adına spesifik IKK inhibitörü PS-1145 ve spesifik NF- κ B nuklear translokasyon inhibitörü SN-50 kullandıklarında TNF- α indüklü hTERT'in nuklear translokasyonunun inhibe edilebileceğini göstermişlerdir (Akiyama ve ark., 2003). Bu çalışma NF- κ B'nin

hTERT nüklear translokasyonunu modüle ederek telomerazın düzenlenmesinde önemli rol oynadığını ve uygun inhibitörler kullanılarak hTERT seviyesini düşürerek telomeraz aktivitesinin inhibe edilebileceğini düşündürmüştür.

Başka bir çalışmada ise Ding ve arkadaşları, Epstein-Barr virüsünün (EBV) temel onkoproteini olan latent membran proteini 1'in (LMP1), hTERT'nin nükleer faktör kappaB (NF-kappaB) p65'e doğrudan bağlanmasını indükleyerek telomeraz aktivitesini modüle ettiğini ve nazofaringeal karsinom hücrelerinde (NPC) her iki proteinin sitoplazmadan çekirdeğe doğru transloke olduklarını göstermişlerdir (Ding ve ark., 2005).

Bu ve benzeri çalışmalar ışığında hTERT ve NF- B arasındaki ilişkinin incelenmesinin, telomeraz aktivitesine olan etkilerini tespit etmede önemli bulgular vereceğini düşünmekteyiz.

Bizim projemizde bu bilgiler doğrultusunda pankreas kanser hücre hattında (PANC-1) Resveratrol' n telomeraz inhibisyonuna olan etkisi üzerinde durulmuş ve hTERT ve NF- B gen ifadeleri üzerindeki etkileri tespit edilmeye çalışılmıştır.

Birkaç araştırmada Resveratrol' n ve telomeraz üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Ancak pankreas kanseri için böyle bir çalışma yapılmamıştır.

Bizde hipotezimizi kurarken Resveratrol' n diğer kanser tiplerindeki etkilerini göz önünde bulundurarak pankreas duktal adenokarsinom hücre hattı PANC-1'deki etkilerini de gözlemlemek istedik. Bunun için öncelikle Resveratrol' n PANC-1 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisini inceledik ve literatürle uyumlu olup olmadığını karşılaştırdık.

Resveratrol' n çeşitli tipteki kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi değerlendirilmiş olup Pankreas duktal adenokarsinom hücre hattı olan PANC-1 'de de Resveratrol'le ilgili pek çok çalışma yapılmış ve sitotoksik etkisi değerlendirilmiştir.

Liu ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada, PANC-1 hücre hattında Resveratrol için 10, 50 ve 100  m şeklinde doz aralıkları belirleyerek 24, 48 ve 72. saatlerde MTT

analizi ile sitotoksik etkisini incelemişler ve Resveratrol'ün doza bağımlı olarak sitotoksik etki gösterdiğini tespit etmişler ve 72. saatte IC₅₀ değerini 62,59 µm olarak hesaplamışlardır (Liu ve ark., 2013).

Cui ve arkadaşları da PANC-1 hücre hattında Resveratrol'ün sitotoksik etkisini göstermek için yine MTT analizi kullanmışlar. Doz aralıklarını 5, 10, 25, 50, 100, 150 ve 200 µm şeklinde belirleyerek 24, 48 ve 72. saatlerdeki etkilerine bakmışlar ve Resveratrol'ün PANC-1 hücrelerinin büyümesini doz ve zamana bağılı olarak inhibi ettiğini belirlemişler ve IC₅₀ değeri 78.3 ± 9.6 µmol/L olarak hesaplamışlardır (Cui ve ark., 2010).

Mo ve arkadaşları ise PANC-1 hücre hattında Resveratrol'ün sitotoksik etkisini göstermek amacıyla hücre sayım kiti-8 (CCK-8) kullanmışlar. Doz aralıklarını 12,5, 25, 50, 100,200 ve 400 µm şeklinde belirleyerek 24, 48 ve 72. saatlerdeki etkilerini belirlemişlerdir. Yine doz ve zamana bağılı olarak artan bir hücre inhibisyonun olduğunu tespit ederek IC₅₀ dozunu 100 µm olarak belirlemişlerdir (Mo ve ark., 2011).

Bizde yaptığımız literatür taraması sonucu Resveratrol için doz aralıkları belirleyerek PANC-1 hücre hattında sitotoksik analizlerini WST-1 reaktifi ile gerçekleştirdik ve doz-zamana bağılı olarak değişkenlik gösteren IC₅₀ değerini tespit ettik. Bulduğumuz IC₅₀ değeri yukarıda bahsedilen çalışmalarla uyumluydu. Bunun sonucunda da, 72. saatte belirlemiş olduğumuz 75,80 µm IC₅₀ değeri ile diğer deneylerimize devam ettik.

Sonraki adımımız Resveratrol'ün PANC-1 hücre serisindeki apoptotik etkisini göstermekti. Literatür araştırması yaptığımızda Resveratrol'ün bu etkisine dair çalışmalara ulaştık ve kendi sonuçlarımızı onlarla kıyasladık.

Cui ve arkadaşları Resveratrol'ün apoptotik etkisini belirlemek adına dört ayrı dozda (25, 50, 100, 200 µm) Resveratrol uyguladıkları çalışma gruplarını kontrole göre kıyaslamışlar ve 48. saatteki apoptoz oranlarını Annexin V yöntemi ile belirlemişlerdir. Kontrol grubunda % 4.90 ± 0.60 oranında apoptoz varken 25, 50, 100, 200 µm resveratrol uyguladıkları gruplarda sırasıyla % 6.56 ± 0.41, 7.99 ± 0.87, 26.20

± 2.21 , $28,84 \pm 3,01$, 33.20 ± 1.46 oranlarında doza bağılı olarak artan apoptotik etkisini belirlemişlerdir (Cui ve ark., 2010).

Ding ve Adrian yapmış oldukları çalışmada yine Resveratrol'ün apoptotik etkisini değerlendirmişler, 72. saatte PANC-1 hücre hattında $100 \mu\text{m}$ Resveratrol uyguladıkları gruba Resveratrol vermedikleri grubu TUNEL Testi kullanarak kıyaslamışlardır. Kontrol grubunda $\% 2 \pm 0.9$ oranında apoptoz gözlenirken doz grubunda $\% 44 \pm 12$ oranında apoptoz saptanarak Resveratrol'ün apoptotik etkisini göstermişlerdir (Ding, Adrian, 2002).

Duan ve arkadaşlarıda PANC-1 hücre serisinde Resveratrol'ün apoptotik etkisini belirlemek için Annexin V yöntemini kullanmışlar. Çalışma gruplarına 5 ve $50 \mu\text{m}$ olarak iki farklı doz şeklinde Resveratrol vermişlerdir. Kontrol grubu ise etken madde içermeyen hücre grubu olarak ayarlanmış. 48. saatte deney durdurularak Annexin V analizi yaptıklarında kontrol grubunda $\% 12,15$ apoptoz saptanırken, $5 \mu\text{m}$ doz grubunda $\% 26,53$ oranında, $50 \mu\text{m}$ doz grubunda ise $\% 30,85$ oranında doza bağılı olarak artan apoptotik etki saptamışlardır (Duan ve ark., 2016).

Bizde apoptoz deneyini gerçekleştirmek için belirlemiş olduğumuz IC_{50} dozunu kullandık. Etken madde verdiğimiz grup çalışma grubu olarak belirlenirken, madde vermediğimiz grup kontrol grubu olarak belirlendi. IC_{50} dozu 72. saatte belirlenmiş olduğu için apoptoz deneyide 72. saat için bakıldı ve sonuçlar Annexin V yöntemi ile analiz edildi. Sonuç olarak kontrole göre kıyaslama yaptığımızda etken madde verdiğimiz grupta $\% 41,9$ oranında apoptotik etki belirledik Bulduğumuz sonuçlar yukarıda da belirttiğimiz literatür bilgisine uygun şekildeydi.

Araştırmamızda Resveratrol'ün sitotoksik ve apoptotik etkisini gözlemledikten sonra hücre göçüne olan etkisini incelemek amacıyla yara kapanma (wound healing) deneyini gerçekleştirdik ve bulgularımızı literatür bilgileri ile kıyasladık.

Li ve arkadaşları PANC-1 hücre serisinde hipoksinin tetiklemiş olduğu hücre göçü artışına karşı Resveratrol'ün etkilerini değerlendirmişler. 12.5 , 25 ve $50 \mu\text{m}$ dozlar şeklinde uyguladıkları Resveratrol'ün 0. ve 24. saatlerdeki etkilerini Nikon Diaphot

TMD ters mikroskop altında değerlendirdiklerinde belirgin bir şekilde artan doza bağlı olarak hücre göçünü engellediğini tespit etmişlerdir (Li ve ark., 2016).

Cao ve arkadaşları ise PANC-1 hücre serisinde hiperglisemi uygulaması sonucu artmış hücre göçünde Resveratrol'ün etkisini incelemişler ve yara hattı oluşturulduktan sonra 0. ve 24. saat görüntülerini Nikon Diaphot TMD ters mikroskop altında görüntülemişlerdir. Sonuçlara göre 25mM glukoz uygulanan hücre grubunda Resveratrol'ün, artmış hücre göçünü anlamlı bir şekilde azalttığını belirtmişlerdir (Cao ve ark., 2016).

Bizim sonuçlarımıza bakacak olursak Resveratrol için saptadığımız IC₅₀ dozu çalışma grubunda yara iyileşmesini % 47 oranında azalttı ve hücre göçünü geciktirdi. Ancak sonuçlarımız anlamlı olarak değerlendirilmedi.

Kanser hücrelerinde sınırsız üreme yeteneği telomeraz aktivitesinin artmış olması ile ilişkilendirilmiştir. Telomeraz somatik hücrelerde inaktif bir haldeyken kanser hücrelerinde belirgin bir şekilde aktivasyon gösterir. Tümör hücrelerinde telomeraz aktivitesi ve proliferasyon kapasitesi arasındaki çarpıcı korelasyonlar göz önüne alındığında, telomeraz kanser terapötiklerinde potansiyel olarak önemli bir moleküler hedef olarak kabul edilmiştir. Çünkü normal hücrelerin tümör hücrelerine geçiş sürecine çoğunlukla telomeraz aktivasyonu eşlik eder. hTERT ters transkriptaz özellik gösteren ve telomerazın enzimatik aktivitesini düzenleyen alt birimidir. Özellikle bu alt birim kanser hücrelerinde artmış telomeraz aktivitesiyle doğrudan ilişkilendirilmiştir.

hTERT'in artmış ifadesiyle ilişkili mekanizma henüz belli değildir ve düzenlenmesinde pek çok etken mevcuttur. Ancak hTERT'in nuklear translokasyonunda yer alan NF-κB ile ilişkisinin araştırılması dikkat çekici unsurlardan biri olabilir. Çünkü yapılan çalışmalarda NF-κB'nin hTERT'in nukleusa translokasyonunu sağlayarak telomeraz aktivitesini düzenlediği tespit edilmiştir.

Litaratürde Resveratrol'ün bu genler üzerindeki etkileriyle ilgili çalışmalar mevcuttur. Ancak pankreas duktal karsinomda böyle bir çalışma yapılmadığı gözlenmiştir. Bu

nedenle biz araştırmamızda bu kanser tipi üzerindeki etkileri değerlendirmeyi amaçladık.

Resveratrol'ün PANC-1 hücre serisinde, bu düzenek üzerinde etkisi olup olmadığını görmek adına belirlemiş olduğumuz IC₅₀ dozunun NF-κB ve hTERT mRNA ekspresyon düzeyleri üzerindeki etkilerini değerlendirdik ve bunları telomeraz aktivitesiyle ilişkilendirmek istedik.

NF-κB, hücre ölümü, proliferasyonu ve farklılaşma süreçlerinde yer alan çeşitli hücresel sinyal yollarını düzenleyen önemli bir transkripsiyon faktörüdür. Birçok kanser alışması NF-κB'nin, kanser hücrelerinin bağışıklık sistemi tarafından reddedilmeden çoğalması için uygun bir mikro ortam oluşturmak için hareket ettiğini göstermektedir (Wu ve ark., 2017).

Wu ve arkadaşları NF-κB'nin bu özelliğini göze alarak yaptıkları çalışmada, melanoma kanser hücre hatları olan A375 ve MV3 'de, miR-221'e etkilerini inhibe etmenin hücresel mekanizmasını araştırmak için Resveratrol ile tedavi edildikten sonra NF-κB ekspresyon seviyesini değerlendirmişlerdir. Çalışma gruplarına 50 μM Resveratrol uygulandıktan 24 saat sonra ekspresyon seviyeleri qRT-PCR ile analiz edilmiş ve sonuçlar Resveratrol'ün NF-κB aktivasyonunu inhibe edebileceğini göstermiştir (Wu ve ark., 2017).

Zhai ve ark. yaptıkları bir çalışmada insan A431 epidermoid karsinom hücrelerinde Resveratrol'ün farklı konsantrasyonlarını deneyerek, telomeraz ters transkriptaz (hTERT) ifadesindeki değişimle birlikte telomeraz aktivitesindeki etkilerini göstermişlerdir. Sonuç olarak Resveratrol, hTERT protein ifadesini aşağı regüle edebilir ve A431 hücre hattında telomeraz yeteneğini inhibe edebilir sonucuna ulaşmışlardır (Zhai ve ark., 2016).

Mirzazadeh ve ark. yaptıkları çalışmada kötü bir prognoza sahip olan ve en yaygın, agresif beyin tümörü glioblastoma hücre hattı U-87MG 'nin Resveratrol ile farklı zaman ve dozlarda tedavisinde telomeraz düzeyini değerlendirmişlerdir. Bunun için kanser hücrelerinin % 85'inden fazlasında eksprese edilen ve telomeraz enziminin anahtar alt birimi olan "hTERT" mRNA ifadesi RT-PCR kullanılarak incelemişler ve Resveratrol'ün, telomeraz enziminin katalitik alt birimi olan hTERT'nin mRNA

ifadesini önemli ölçüde azalttığını göstererek GBM tedavisi için potansiyel terapötik ajan olarak değerlendirmişlerdir (Mirzazadeh ve ark., 2017).

Bizim tespit etmiş olduğumuz sonuçlara göre Resveratrol'ün IC₅₀ dozu hTERT geninde 1,37 kat, NF-κB geninde ise 1,55 kat ekspresyon seviyesinde artışa neden oldu. RT-PCR sonuçlarımız literatürle uyumlu değildi ve gen ifadelerini beklenildiği şekilde azalma göstermediği beirlendi. Resveratrol'ün bu genler üzerindeki etkilerini daha iyi görebilmek için ve telomerazla olan ilişkisini daha iyi anlayabilmek için hTERT ve NF-κB genlerinin protein ifadelerine ve fosforilasyon düzeylerine de bakılarak değerlendirmeye gidilebileceğini düşündürdü. Ayrıca telomeraz aktivitesinin Tartrate Resistant Acid Phosphatase (TRAP) Elisa yöntemi ile değerlendirilmesinin bu genlerin etkilerini ortaya koymaları açısından yarar sağlayabileceğini akla getirdi.

6.Sonuç ve Öneriler

Resveratrol son zamanlarda çalışmalarda oldukça yer alan ve kanser hücreleri üzerindeki kemopreventif ve kemoterapötik potansiyeli olan bir etken maddedir. Bu etkilerinin keşfinden bu yana da pek çok araştırmanın konusu olmuştur. Bizde bu etkilerini kötü bir prognoza sahip olan ve kansere bağlı ölümlerde dördüncü sırada yer alan pankreas kanseri için değerlendirmek istedik.

Sonuç olarak Resveratrol'ün pankreas duktal adenokarsinom hücre hattı olan PANC-1 hücreleri üzerinde sitotoksik ve apoptotik etkisinin olduğunu literatürle uyumlu bir şekilde tespit ettik. Ayrıca Resveratrol'ün PANC-1 hücrelerinde invazyon ve migrasyonu önleyerek hücre göçünü inhibe ettiğini gözlemledik. Telomerazla ilişkilendirdiğimiz genler olan hTERT ve NF- κ B gen ifadeleri beklediğimiz gibi azalmadı ve RT-PCR sonuçlarımız literatürle uyumlu değildi. Bu nedenle sonraki çalışmalarda Resveratrol'ün bu genler üzerindeki etkisini daha iyi anlayabilmek için ve telomeraz aktivitesiyle ilişkilendirebilmek için bu genlerin protein ifadeleri ve fosforilasyon düzeylerine bakılmasının uygun olacağını ve ayrıca Telomeraz aktivitesinin ELİSA yöntemiyle ayrı bir şekilde değerlendirmeye alınmasının yarar sağlayacağını düşündük. Ayrıca Resveratrol'ün etkisini daha da belirginleştirmek adına farklı kemoterapik ajanlarla kullanımı ve birlikte olan etkilerini gözlemlemenin farklı bir bakış açısı kazandırabileceği değerlendirmesini yaptık.

Referanslar

- Al-Hawary, M. M., Kaza, R. K., Azar, S. F., Ruma, J. A., & Francis, I. R. (2013). Mimics of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Imaging*. <https://doi.org/10.1102/1470-7330.2013.9012>
- Akiyama, M., Hideshima, T., Hayashi, T., Tai, Y. T., Mitsiades, C. S., Mitsiades, N., ... Anderson, K. C. (2003). Nuclear factor- κ B p65 mediates tumor necrosis factor α -induced nuclear translocation of telomerase reverse transcriptase protein. *Cancer Research*, 63(1), 18–21.
- Bilimoria, K. Y., Bentrem, D. J., Ko, C. Y., Ritchey, J., Stewart, A. K., Winchester, D. P., & Talamonti, M. S. (2007). Validation of the 6th edition AJCC pancreatic cancer staging system. *Cancer*, 110(4), 738–744. doi:10.1002/cncr.22852
- Bay, S., & Çiçek, H. (2007). Yaşlanma ve Telomera z Aging and Telomerase, 5(3), 111–115.
- Bishayee, A. (2009). Cancer prevention and treatment with resveratrol: From rodent studies to clinical trials. *Cancer Prevention Research*. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-08-0160>
- Cao, L., Chen, X., Xiao, X., Ma, Q., & Li, W. (2016). Resveratrol inhibits hyperglycemia-driven ROS-induced invasion and migration of pancreatic cancer cells via suppression of the ERK and p38 MAPK signaling pathways. *International Journal of Oncology*, 49(2), 735–743. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3559>
- Carter, L. G., D’Orazio, J. A., & Pearson, K. J. (2014). Resveratrol and cancer: Focus on in vivo evidence. *Endocrine-Related Cancer*. BioScientifica Ltd. <https://doi.org/10.1530/ERC-13-0171>
- Catalgol, B., Batirel, S., Taga, Y., & Ozer, N. K. (2012). Resveratrol: French paradox revisited. *Frontiers in Pharmacology*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00141>

- Cartwright, T., Richards, D. A., & Boehm, K. A. (2008). Cancer of the pancreas: Are we making progress? A review of studies in the US Oncology Research Network. *Cancer Control*. H. Lee Moffitt Cancer Center and Research Institute. <https://doi.org/10.1177/107327480801500405>
- Cherif, H., Tarry, J. L., Ozanne, S. E., & Hales, C. N. (2003). Ageing and telomeres: A study into organ- and gender-specific telomere shortening. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg208>
- Collisson, E. A., Bailey, P., Chang, D. K., & Biankin, A. V. (2019, April 1). Molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0109-y>
- Cui, J., Sun, R., Yu, Y., Gou, S., Zhao, G., & Wang, C. (2010). Antiproliferative effect of resveratrol in pancreatic cancer cells. *Phytotherapy Research*, 24(11), 1637–1644. <https://doi.org/10.1002/ptr.3157>
- Daniel M., Tollefsbol TO., (2018). Pterostilbene down-regulates hTERT at physiological concentrations in breast cancer cells: Potentially through the inhibition of cMyc, 119(4):3326-3337. doi: 10.1002/jcb.26495)
- De Lange, T. (2005). Shelterin: The protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.1346005>
- Dikmen, G., & Doğan, P. (2003). Telomeraz Ve Kanser. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 23(4), 334–341
- Ding, L., Li, L. L., Yang, J., Yong, G. T., Ye, M., Shi, Y., ... Cao, Y. (2005). Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein 1 modulates nuclear translocation of telomerase reverse transcriptase protein by activating nuclear factor- κ B p65 in human nasopharyngeal carcinoma cells. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 37(9), 1881–1889. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.04.012>

- Ding, X. Z., & Adrian, T. E. (2002). Resveratrol inhibits proliferation and induces apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Nursing*, 25(4). <https://doi.org/10.1097/00006676-200211000-00024>
- Dolcet, X., Llobet, D., Pallares, J., & Matias-Guiu, X. (2005). NF-kB in development and progression of human cancer. *Virchows Archiv*. <https://doi.org/10.1007/s00428-005-1264-9>
- Dolenšek, J., Rupnik, M. S., & Stožer, A. (2015, January 1). Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas. *Islets*. Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/19382014.2015.1024405>
- Duan, J., Yue, W., Jianyu, E., Malhotra, J., Lu, S. E., Gu, J., ... Tan, X. L. (2016). In vitro comparative studies of resveratrol and triacetylresveratrol on cell proliferation, apoptosis, and STAT3 and NF- κ B signaling in pancreatic cancer cells. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep31672>
- Dubois, P. M. (1994). The Exocrine and Endocrine Pancreas: Embryology and Histology (pp. 1–8). https://doi.org/10.1007/978-3-642-97487-8_1
- Eccles, S. A., Box, C., & Court, W. (2005, September 28). Cell migration/invasion assays and their application in cancer drug discovery. *Biotechnology Annual Review*. [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(05\)11013-8](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11013-8)
- Falomir, E., Lucas, R., Peñalver, P., Martí-Centelles, R., Dupont, A., Zafra-Gómez, A., ... Morales, J. C. (2016). Cytotoxic, Antiangiogenic and Antitelomerase Activity of Glucosyl- and Acyl- Resveratrol Prodrugs and Resveratrol Sulfate Metabolites. *ChemBioChem*, 1343–1348. <https://doi.org/10.1002/cbic.201600084>
- Feldmann, G., Beaty, R., Hruban, R. H., & Maitra, A. (2007). Molecular genetics of pancreatic intraepithelial neoplasia. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery*, 14(3), 224–232. doi:10.1007/s00534-006-1166-5

- Flores, I., Canela, A., Vera, E., Tejera, A., Cotsarelis, G., & Blasco, M. A. (2008). The longest telomeres: A general signature of adult stem cell compartments. *Genes and Development*, 22(5), 654–667. <https://doi.org/10.1101/gad.451008>
- Fogel, E. L., Shahda, S., Sandrasegaran, K., Dewitt, J., Easler, J. J., Agarwal, D. M., ... Sherman, S. (2017, April 1). A Multidisciplinary Approach to Pancreas Cancer in 2016: A Review. *American Journal of Gastroenterology*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/ajg.2016.610>
- Gallmeier, E., & Gress, T. M. (2018). Pancreatic ductal adenocarcinoma. *Internist*, 59(8), 805–822. <https://doi.org/10.1007/s00108-018-0460-z>
- Gandhi, N. S., Feldman, M. K., Le, O., & Morris-Stiff, G. (2018). Imaging mimics of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Abdominal Radiology*, 43(2), 273–284. <https://doi.org/10.1007/s00261-017-1330-1>
- Ghosh, A., Saginc, G., Leow, S. C., Khattar, E., Shin, E. M., Yan, T. D., ... Tergaonkar, V. (2012). Telomerase directly regulates NF- κ B-dependent transcription. *Nature Cell Biology*, 14(12), 1270–1281. <https://doi.org/10.1038/ncb2621>
- Grant, T. J., Hua, K., & Singh, A. (2016). Molecular Pathogenesis of Pancreatic Cancer. *Molecular and Cellular Changes in the Cancer Cell*, 241–275. doi:10.1016/bs.pmbts.2016.09.008
- Hannen, R., & Bartsch, J. W. (2018, June 1). Essential roles of telomerase reverse transcriptase hTERT in cancer stemness and metastasis. *FEBS Letters*. Wiley Blackwell. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13084>
- Henry, B. M., Skinningsrud, B., Saganiak, K., Pękala, P. A., Walocha, J. A., & Tomaszewski, K. A. (2019). Development of the human pancreas and its vasculature An integrated review covering anatomical, embryological, histological, and molecular aspects. *Annals of Anatomy*. Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2018.09.008>

- He, X. Y., & Yuan, Y. Z. (2014). Advances in pancreatic cancer research: Moving towards early detection. *World Journal of Gastroenterology*. WJG Press. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i32.11241>
- Hidalgo, M. (2011). Pancreatic Cancer: Overview. *Lancet*, 378(9791), 1605–1617. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)62307-0.Pancreatic](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62307-0.Pancreatic)
- Hruban, R. H., & Klimstra, D. S. (2014). Adenocarcinoma of the pancreas. *Seminars in Diagnostic Pathology*, 31(6), 443–451. <https://doi.org/10.1053/j.semdp.2014.08.004>
- International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. Global Cancer Observatory 2018; Available from: URL: <http://gco.iarc.fr/>
- Janknecht, R. (2004, April 23). On the road to immortality: hTERT upregulation in cancer cells. *FEBS Letters*. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(04\)00356-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(04)00356-4)
- Jiang, Z., Chen, K., Cheng, L., Yan, B., Qian, W., Cao, J., ... Yang, W. (2017). Resveratrol and cancer treatment: Updates. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1111/nyas.13466>
- Jimenez, R. ve C. Fernandez-del Castillo. (2010). Tumors of the pancreas. *Sleisenger and Fordtran's gastrointestinal and liver disease: pathophysiology, diagnosis, management*. (2010) 9. Baskı. Philadelphia: Saunders Elsevier, s. 1017-1024
- Jutric, Z., Melstrom, L. G., (2017). New Treatment Options and Management Considerations in Borderline Resectable Pancreatic Cancer. *Oncology (Williston Park)*. 15;31(6):443-52.
- Kimura, A., Ohmichi, M., Kawagoe, J., Kyo, S., Mabuchi, S., Takahashi, T., ... Murata, Y. (2004). Induction of hTERT expression and phosphorylation by estrogen via Akt cascade in human ovarian cancer cell lines. *Oncogene*, 23(26), 4505–4515. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207582>

- Ko, J. H., Sethi, G., Um, J. Y., Shanmugam, M. K., Arfuso, F., Kumar, A. P., ... Ahn, K. S. (2017, December 1). The role of resveratrol in cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms18122589>
- Lambert, A., Schwarz, L., Borbath, I., Henry, A., Van Laethem, J.-L., Malka, D., ... Conroy, T. (2019). An update on treatment options for pancreatic adenocarcinoma. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 11, 175883591987556. doi:10.1177/1758835919875568
- Lanzilli, G., Fuggetta, M. P., Tricarico, M., Cottarelli, A., Serafino, A., Falchetti, R., ... Bonmassar, E. (2006). Resveratrol down-regulates the growth and telomerase activity of breast cancer cells in vitro. *International Journal of Oncology*, 28(3), 641–648. <https://doi.org/10.3892/ijo.28.3.641>
- Lee, E. S., & Lee, J. M. (2014). Imaging diagnosis of pancreatic cancer: A state-of-the-art review. *World Journal of Gastroenterology*, 20(24), 7864–7877. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i24.7864>
- Liu, P., Liang, H., Xia, Q., Li, P., Kong, H., Lei, P., ... Tu, Z. (2013). Resveratrol induces apoptosis of pancreatic cancers cells by inhibiting miR-21 regulation of BCL-2 expression. *Clinical and Translational Oncology*, 15(9), 741–746. <https://doi.org/10.1007/s12094-012-0999-4>
- Li, W., Cao, L., Chen, X., Lei, J., & Ma, Q. (2016). Resveratrol inhibits hypoxia-driven ROS-induced invasive and migratory ability of pancreatic cancer cells via suppression of the Hedgehog signaling pathway. *Oncology Reports*, 35(3), 1718–1726. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4504>
- Lippi, G., & Mattiuzzi, C. (2020). The global burden of pancreatic cancer. *Archives of Medical Science*, 16(4), 820–824. <https://doi.org/10.5114/aoms.2020.94845>

- McGuigan, A., Kelly, P., Turkington, R. C., Jones, C., Coleman, H. G., & McCain, R. S. (2018, November 21). Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World Journal of Gastroenterology*. Baishideng Publishing Group Co., Limited. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i43.4846>
- Mirzazadeh, A., Kheirollahi, M., Farashahi, E., Sadeghian-Nodoushan, F., Sheikhha, M., & Aflatoonian, B. (2017). Assessment Effects of Resveratrol on Human Telomerase Reverse Transcriptase Messenger Ribonucleic Acid Transcript in Human Glioblastoma. *Advanced Biomedical Research*, 6(1), 73.
<https://doi.org/10.4103/2277-9175.209047>
- Mitchell, S., Vargas, J., & Hoffmann, A. (2016). Signaling via the NFκB system. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*. Wiley-Blackwell.
<https://doi.org/10.1002/wsbm.1331>
- Mohammed, S., Van Buren, G., & Fisher, W. E. (2014). Pancreatic cancer: Advances in treatment. *World Journal of Gastroenterology*, 20(28), 9354–9360.
<https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i28.9354>
- Mo, W., Xu, X., Xu, L., Wang, F., Ke, A., Wang, X., & Guo, C. (2011). Resveratrol inhibits proliferation and induces apoptosis through the hedgehog signaling pathway in pancreatic cancer cell. *Pancreatology*, 11(6), 601–609.
<https://doi.org/10.1159/000333542>
- Mukherjee, S., Firpo, E. J., Wang, Y., & Roberts, J. M. (2011). Separation of telomerase functions by reverse genetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(50). <https://doi.org/10.1073/pnas.1112414108>
- Naqvi, A. A. T., Hasan, G. M., & Hassan, M. I. (2018, March 1). Investigating the role of transcription factors of pancreas development in pancreatic cancer. *Pancreatology*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2017.12.013>

- Newbold, R. F. (2002). The significance of telomerase activation and cellular immortalization in human cancer. *Mutagenesis*, 17(6), 539–550.
<https://doi.org/10.1093/mutage/17.6.539>
- Oeseburg, H., De Boer, R. A., Van Gilst, W. H., & Van Der Harst, P. (2010, January). Telomere biology in healthy aging and disease. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*.
<https://doi.org/10.1007/s00424-009-0728-1>
- Ohuchida K., Mizumoto K., Yamada D., Yamaguchi H., Konomi H., Nagai E., Yamaguchi K., Tsuneyoshi M., Tanaka M., (2006). Quantitative analysis of human telomerase reverse transcriptase in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 12: 2066-2069. doi: 10.1158 / 1078-0432.CCR-05-1821)
- Pandiri, A. R. (2013). Overview of Exocrine Pancreatic Pathobiology. *Toxicologic Pathology*, 42(1), 207–216. doi:10.1177/0192623313509907
- Pezzuto, J. M. (2019). Resveratrol: Twenty years of growth, development and controversy. *Biomolecules and Therapeutics*. Korean Society of Applied Pharmacology.
<https://doi.org/10.4062/biomolther.2018.176>
- Popli, D. B., Sircar, K., Chowdhry, A.,(2017). Telomerase: An exploration toward the end of cancer. *Indian J Dent Res*. 2017 Sep-Oct;28(5):574-584. doi: 10.4103/ijdr.IJDR_690_16.
- Pu, N., Yin, L., Habib, J. R., Gao, S., Hu, H., Zhu, Y., ... Lou, W. (2019). Optimized modification of the eighth edition of AJCC TNM staging system for resected pancreatic ductal adenocarcinoma. *Future Oncology*, 15(30), 3457–3465.
<https://doi.org/10.2217/fon-2019-0264>
- Ralph H., Hruban, ve David S., Klimstra. (2014). Adenocarcinoma of the pancreas. *Seminars in Diagnostic Pathology*, 31(6): (s. 443–451).

- Raimondi, S., Lowenfels, A. B., Morselli-Labate, A. M., Maisonneuve, P., & Pezzilli, R. (2010). Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; Aetiology, incidence, and early detection. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*, 24(3), 349–358. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2010.02.007>
- Raufi, A. G., Manji, G. A., Chabot, J. A., & Bates, S. E. (2019, February 1). Neoadjuvant Treatment for Pancreatic Cancer. *Seminars in Oncology*. W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2018.12.002>
- Sawabu N., Watanabe H., Yamaguchi Y., Ohtsubo K., Motoo Y.,(2004) Serum tumor markers and molecular biological diagnosis in pancreatic cancer. *Pancreas*;28:263–7.
- Schmidt, J. C., & Cech, T. R. (2015). Human telomerase: Biogenesis, trafficking, recruitment, and activation. *Genes and Development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/gad.263863.115>
- Schrank, Z., Khan, N., Osude, C., Singh, S., Miller, R. J., Merrick, C., ... Puri, N. (2018, September 5). Oligonucleotides targeting telomeres and telomerase in cancer. *Molecules*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules23092267>
- Seufferlein, T., & Ettrich, T. J. (2019). Treatment of pancreatic cancer—neoadjuvant treatment in resectable pancreatic cancer (PDAC). *Translational Gastroenterology and Hepatology*, 4(March). <https://doi.org/10.21037/tgh.2019.03.05>
- Shay, J. W. (1999). MOLECULAR BIOLOGY: Mutant Dyskerin Ends Relationship with Telomerase. *Science*, 286(5448), 2284–2285.
- Suda, K., Nobukawa, B., Takase, M., & Hayashi, T. (2006, April). Pancreatic segmentation on an embryological and anatomical basis. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery*. <https://doi.org/10.1007/s00534-005-1039-3>
- Thipe, V. C., Amiri, K. P., Bloebaum, P., Karikachery, A. R., Khoobchandani, M., Katti, K. K., ... Katti, K. V. (2019). Development of resveratrol-conjugated gold nanoparticles: Interrelationship of increased resveratrol corona on anti-tumor efficacy against breast,

pancreatic and prostate cancers. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 4413–4428. <https://doi.org/10.2147/IJN.S204443>

Tirma, A. R. A. Ş. (2006). Mesane Kanserli Hastaların İdrar Örneklerinde Telomeraz Enzim Aktivitesi, 20(6), 423–426

Valentovic M.A., (2018). Evaluation of Resveratrol in Cancer Patients and Experimental Models,,10.1016/bs.acr.2017.11.006, (171-188)

Van Hoe, L., & Claijens, B. (1999). The Pancreas: Normal Radiological Anatomy and Variants (pp. 19–68). https://doi.org/10.1007/978-3-642-58380-3_3

Van Roessel, S., Kasumova, G. G., Verheij, J., Najarian, R. M., Maggino, L., de Pastena, M., ... Besselink, M. G. (2018). International Validation of the Eighth Edition of the American Joint Committee on Cancer (AJCC) TNM Staging System in Patients With Resected Pancreatic Cancer. *JAMA Surgery*, e183617. doi:10.1001/jamasurg.2018.3617

Wang, J. C., & Bennett, M. R. (2010). Nuclear factor- κ B-mediated regulation of telomerase: The Myc link. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.216937>

Wang, W., Luo, H. S., & Yu, B. P. (2004). Expression of NF- κ B and human telomerase reverse transcriptase in gastric cancer and precancerous lesions. *World Journal of Gastroenterology*, 10(2), 177–181. <https://doi.org/10.3748/wjg.v10.i2.177>

Wu, F., & Cui, L. (2017). Resveratrol suppresses melanoma by inhibiting NF- κ B/miR-221 and inducing TFG expression. *Archives of Dermatological Research*, 309(10), 823–831. <https://doi.org/10.1007/s00403-017-1784-6>

Xia, N., Daiber, A., Förstermann, U., & Li, H. (2017). Antioxidant effects of resveratrol in the cardiovascular system. *British Journal of Pharmacology*. John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/bph.13492>

- Xu, Q., Zong, L., Chen, X., Jiang, Z., Nan, L., Li, J., ... Ma, Z. (2015). Resveratrol in the treatment of pancreatic cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1348(1), 10–19. <https://doi.org/10.1111/nyas.12837>
- Yildiz, M. G., Aras, S., & Duman, D. C. (2009). TELOMERLERİN Yaşlanma Ve Kaılışisindeki Rolü, 66(4), 187–195.
- Yin, L., Hubbard, A. K., & Giardina, C. (2000). NF-κB regulates transcription of the mouse telomerase catalytic subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 275(47), 36671–36675. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007378200>
- Zhai, X. X., Ding, J. C., Tang, Z. M., Li, J. G., Li, Y. C., Yan, Y. H., ... Zhang, C. X. (2016). Effects of resveratrol on the proliferation, apoptosis and telomerase ability of human A431 epidermoid carcinoma cells. *Oncology Letters*, 11(5), 3015–3018. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4351>
- Zhang, L., Sanagapalli, S., & Stoita, A. (2018). Challenges in diagnosis of pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology*. Baishideng Publishing Group Co., Limited. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i19.2047>
- Zvereva, M. I., Shcherbakova, D. M., & Dontsova, O. A. (2010, December). Telomerase: Structure, functions, and activity regulation. *Biochemistry (Moscow)*. <https://doi.org/10.1134/S0006297910130055>

